

Université de Sherbrooke

Inhibition des effets du VEGF sur l'angiogenèse dans le diabète : implication de SHP-1

Par
Raphaël Béland
Programme de Physiologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.)
en Physiologie

Sherbrooke, Québec, Canada
Septembre 2018

Membres du jury d'évaluation
Pedro Geraldès, programme de physiologie
Robert Dumaine, programme de physiologie
Pedro d'Orléans-Juste, programme de pharmacologie

© Raphaël Béland, 2018

RÉSUMÉ

Inhibition des effets du VEGF sur l'angiogenèse dans le diabète : implication de SHP-1

Par

Raphaël Béland

Programme de Physiologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de maître ès sciences (M.Sc.) en physiologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

La maladie des artères périphériques (MAP) est une complication macrovasculaire du diabète qui augmente le risque d'amputations des membres inférieurs. Notre équipe a montré une réduction de la revascularisation suivant une ischémie du membre inférieur chez les souris diabétiques en comparaison aux souris non-diabétiques, associée à une baisse de l'activation du récepteur au facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) et à une hausse de l'expression de la protéine tyrosine phosphatase SHP-1 dans le muscle ischémique. Notre objectif est d'élucider les mécanismes cellulaires impliqués dans la réduction des voies de signalisation du VEGF, dans les cellules endothéliales d'aortes bovines (BAEC) exposées à des concentrations élevées de glucose et hypoxiques. Les BAEC ont été exposées en milieu normal (5.6 mM; NG) ou élevé (25 mM; HG) de glucose pendant 24-48h dont les derniers 16-24h en condition normoxique (21% d'O₂) ou hypoxique (1% d'O₂). Les cellules ont par la suite été stimulées au VEGF (10-25 ng/ml) pendant 10 min ou 24h. Des essais de prolifération cellulaire, de migration cellulaire, d'angiogenèse ont été effectués. L'expression de p-Akt, p-ERK et de p-VEGFR2 a été mesurée par immunobuvardage. L'expression de phosphatases (SHP-1, SHP-2, PTP1B et VE-PTP) a été mesurée par immunobuvardage et PCR quantitative. Des co-immunoprécipitations et essais phosphatases ont été réalisés. Pour valider le rôle de SHP-1 sur les effets du VEGF, une forme dominante-négative de SHP-1 a été surexprimée. L'activité phosphatase de SHP-1 et son interaction avec le récepteur au VEGF (VEGFR2) étaient augmentés chez les BAEC exposées en HG avec ou sans hypoxie. En normoxie, une baisse des effets du VEGF a été observée sur l'activation de VEGFR2 en HG. Une réduction des effets du VEGF en HG sur l'activation d'Akt en normoxie (-66%) et hypoxie (-54%) a été mesurée. L'exposition des BAEC en HG a aussi réduit les effets du VEGF sur l'activation d'ERK en normoxie (-76%) et en hypoxie (-87%). En normoxie, l'hyperglycémie a réduit les actions du VEGF sur la prolifération cellulaire (-100%), la migration cellulaire (-98%) et la formation de tubules (-93%). En hypoxie, l'hyperglycémie a aussi réduit les actions du VEGF sur la prolifération cellulaire (-100%), la migration cellulaire (-100%) et la formation de tubules (-75%). Aucune variation de l'expression de SHP-1, SHP-2, PTP1B et de VE-PTP ne fut constatée. La surexpression d'une forme dominante-négative de SHP-1 a rétabli les effets mitogéniques du VEGF en HG et semble rétablir ceux-ci sur l'activation d'Akt et d'ERK en normoxie. Nos résultats suggèrent que l'augmentation de l'activité phosphatase et interaction de SHP-1 induite par l'hyperglycémie et l'hypoxie inhibe les effets du VEGF dans les BAEC, pouvant expliquer la faible formation de vaisseaux collatéraux dans le diabète.

Mots clés : Maladie des artères périphériques, hypoxie, angiogenèse, VEGF, SHP-1

SUMMARY

Inhibition of VEGF pro-angiogenic effects in diabetes : role of SHP-1

By
Raphaël Béland
Physiology Program

Thesis presented at the Faculty of medicine and health sciences for the obtention of Master degree diploma maitre ès sciences (M.Sc.) in physiology, Faculty of medicine and health sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Peripheral arterial disease (PAD) is a macrovascular complication of diabetes that increases the risk of lower extremity amputation. Data published by our laboratory showed that diabetic mice had reduced revascularization following lower limb ischemia compared to non-diabetic mice. The reduction of blood flow in diabetic mice was associated with decreased activation of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor and increased expression of the protein tyrosine phosphatase SHP-1 in ischemic muscles. The aim of this study was to investigate the cellular mechanisms involved in reduced VEGF receptor 2 (VEGFR2) signaling pathways in endothelial cells exposed to high glucose levels and hypoxia. Cultured bovine aortic endothelial cells (BAEC) were exposed to normal (5.6 mM; NG) or high glucose (25 mM; HG) levels for 24-48 hours with or without hypoxia (1% O₂) for the last 16-24 hours. BAEC were stimulated with VEGF (10-25 ng/ml) for 10 min or 24 hours and cell proliferation, cell migration and tubule formation were evaluated. The expression of p-Akt, p-ERK and p-VEGFR2 was assessed by immunoblot analyses. The expression of phosphatase such as SHP-1, SHP-2, PTP1B and VE-PTP was measured by immunoblot analyses and quantitative PCR. Interaction of SHP-1 with VEGFR2 and its activity was evaluated by co-immunoprecipitation assay and phosphatase assay, respectively. Adenoviral vector containing a dominant-negative form of SHP-1 was used to assess the role of SHP-1. The phosphatase activity of SHP-1 and its interaction with VEGFR2 were increased in BAEC exposed to HG levels in both normoxia and hypoxia. We observed a reduction of the activation of VEGFR2 in HG levels and normoxia. A decline of VEGF effects on Akt activation in HG levels was observed in both normoxia (-66%) and hypoxia (-54%). The exposition of BAEC to HG levels decreased VEGF effects on ERK activation in normoxia (-76%) and hypoxia (-87%). In normoxia, HG levels reduced VEGF pro-angiogenic effects on cell proliferation (-100%), cell migration (-98%) and tube formation (-93%). Similarly, HG levels also decreased VEGF-induced cell proliferation (-100%), cell migration (-100%) and tube formation (-75%). No variation of the expression of SHP-1, SHP-2, PTP1B and VE-PTP was observed. However, the overexpression of the dominant-negative form of SHP-1 significantly restored VEGF mitogenic effects in HG levels. The overexpression of SHP-1 dominant negative restored VEGF effects on Akt and ERK activation in HG level and normoxia. Our results suggest that elevated SHP-1 activity and interaction with VEGFR2 induced by hyperglycemia inhibits the pro-angiogenic properties of VEGF in BAEC, providing a mechanism of poor collateral vessel formation in diabetes.

Keywords : Peripheral arterial disease, hypoxia, angiogenesis, VEGF, SHP-1

TABLE DES MATIÈRES

Résumé	iii
Summary	iv
Table des matières	v
Liste des figures.....	ix
Liste des tableaux	xi
Liste des abréviations.....	xii
Hypothèse/Problématique	1
Introduction	2
1.1 Le diabète : Mise en contexte.....	2
1.2 Le désordre angiogénique dans le diabète.....	3
1.2.1 Le stress oxydatif.....	4
1.2.2 La voie des polyols.....	4
1.2.3 La voie des hexosamines.....	5
1.2.4 La voie des AGEs.....	5
1.2.5 La voie de la protéine kinase C (PKC).....	6
1.3 Les types de diabète	8
1.3.1 Physiologie du pancréas : fonctions et régulations.....	8
1.3.2 Le diabète de type 1.....	10
1.3.3 Le diabète de type 2.....	11
1.3.3.1 Incrélines et diabète de type 2.....	12
1.3.4 Autres types de diabète	13
1.3.4.1 Le diabète gestationnel.....	13
1.3.4.2 Formes monogéniques du diabète.....	13
1.4 Les complications vasculaires du diabète.....	14
1.4.1 La vascularisation du membre inférieur.....	14
1.4.2 L'athérosclérose	16

1.4.3	La maladie des artères périphériques	19
1.4.4	La neuropathie diabétique.....	22
1.5	La physiologie d'un vaisseau sanguin	23
1.5.1	Fonction et structure d'un vaisseau sanguin.....	23
1.5.2	Facteurs affectant le diamètre des vaisseaux.....	25
1.6	Le processus angiogénique	28
1.6.1	L'angiogenèse physiologique.....	28
1.6.2	L'angiogenèse pathologique	29
1.6.3	La vasculogenèse	30
1.6.4	L'angiogenèse	32
1.7	L'hypoxie et les HIFs.....	35
1.7.1	La régulation de HIF-1 α	35
1.7.2	Dérégulation de HIF-1 dans le diabète	37
1.7.3	Mécanisme de dérégulation de HIF-1 α en hypoxie par le diabète.....	39
1.7.4	Stratégies thérapeutiques impliquant HIF-1 α	40
1.8	Les facteurs angiogéniques.....	41
1.8.1	Le VEGF	41
1.8.1.1	Les récepteurs au VEGF	42
1.8.1.2	La signalisation du VEGF-A.....	44
1.8.2	Le PDGF	46
1.8.3	L'angiopoïétine	46
1.8.4	SDF-1	47
1.8.5	Effet du diabète sur les facteurs angiogéniques.....	48
1.8.6	Stratégies thérapeutiques impliquant les facteurs angiogéniques.....	49
1.9	Les protéines tyrosine phosphatases.....	51
1.9.1	SHP-1	52
1.9.1.1	Structure et activation de SHP-1.....	53
1.9.2	SHP-2	54
1.9.3	PTP1B	54
1.9.4	VE-PTP	55
Objectifs.....		56
Matériel et méthodes.....		57
2.1	Les cellules endothéliales d'aortes bovines (BAEC).....	57

2.1.1 Extraction des BAEC	57
2.1.2 Milieu de culture des BAEC	58
2.1.3 Culture des BAEC	59
2.1.4 Traitements des BAEC : Voies de signalisation du VEGF en normoxie et hypoxie.....	59
2.1.5 Extraction des BAEC	60
2.2 Analyse de l'expression protéique et immunobuvardage de type Western	61
2.3 Co-immunoprécipitation.....	65
2.4 Essai phosphatase	66
2.5 Prolifération cellulaire	66
2.6 Migration cellulaire	67
2.7 Essai d'angiogenèse sur matrigel.....	69
2.8 Infections Adénovirales	70
2.8.1 Signalisation cellulaire	70
2.8.2 Prolifération et migration cellulaire	71
2.8.3 Essai d'angiogenèse sur matrigel.....	72
2.9 Analyse de l'expression génique	72
2.9.1 Extraction de l'ARNm.....	72
2.9.2 Transcription de l'ADNc.....	73
2.9.3 PCR quantitative (qPCR)	73
2.10 Analyses statistiques.....	75
Résultats.....	76
3.1 Essais de prolifération cellulaire	76
3.2 Essais de migration cellulaire.....	77
3.3 Essais d'angiogenèse sur matrigel.....	78
3.4 Signalisation du VEGF.....	81
3.5 Interaction de SHP-1.....	83
3.6 Activité phosphatase de SHP-1	83
3.7 Expression protéique des phosphatases.....	84
.....	85
3.8 Expression génique des phosphatases	86
3.9 Surexpression d'une forme dominante-négative de SHP-1	87
3.9.1 Essais de prolifération cellulaire	87
3.9.2 Essais de migration cellulaire.....	88

3.9.3 Essais d'angiogenèse.....	90
3.9.4 Signalisation du VEGF.....	92
Discussion	94
Effets de l'hyperglycémie et de l'hypoxie sur les effets mitogéniques du VEGF.....	94
Effets de l'hyperglycémie et de l'hypoxie sur les voies de signalisation VEGF	100
Implication de SHP-1 dans la perte des effets angiogéniques du VEGF.....	103
La surexpression d'une forme dominante-négative de SHP-1 permet de rétablir les effets mitogéniques du VEGF	104
Perspectives.....	106
Conclusion.....	108
Liste des références.....	109

LISTE DES FIGURES

- Figure 1 : Représentation schématique du désordre angiogénique dans le diabète
- Figure 2 : Mécanisme de libération de l'insuline dans les cellules bêta du pancréas
- Figure 3 : Représentation schématique de la vascularisation du membre inférieur
- Figure 4 : Représentation schématique du mécanisme de l'athérosclérose dans une artère
- Figure 5 : Représentation schématique d'une artère obstruée par l'athérosclérose
- Figure 6 : Représentation schématique des couches d'une artère
- Figure 7 : Représentation schématique du mécanisme d'action de l'oxyde nitrique produit par l'endothélium sur le muscle lisse
- Figure 8 : Représentation schématique du mécanisme d'action de l'endothéline sur l'endothélium et le muscle lisse vasculaire
- Figure 9 : Représentation schématique de la vasculogenèse
- Figure 10 : Représentation schématique de l'angiogenèse au niveau d'un capillaire
- Figure 11 : Régulation d'HIF-1 α en normoxie et en hypoxie
- Figure 12 : Représentation schématique de la dérégulation d'HIF-1 α en hypoxie par le diabète
- Figure 13 : Les récepteurs au VEGF et leurs ligands
- Figure 14 : La signalisation de VEGFR2/2 et de son ligand VEGF-A
- Figure 15 : Structure et activation de SHP-1
- Figure 16 : Traitement des BAEC
- Figure 17 : Traitement des BAEC pour la prolifération cellulaire
- Figure 18 : Traitement des BAEC pour la migration cellulaire
- Figure 19 : Traitement des BAEC pour les essais d'angiogenèse
- Figure 20 : Programme pour le qPCR
- Figure 21 : Effets de concentrations élevées de glucose sur la prolifération cellulaire induite par le VEGF
- Figure 22 : Effets de concentrations élevées de glucose sur la migration cellulaire induite par le VEGF
- Figure 23 : Effets de concentrations élevées de glucose sur la formation de tubules induite par le VEGF
- Figure 24 : Signalisation de VEGFR2, d'Akt et d'ERK
- Figure 25 : Interaction de SHP-1

Figure 26 : Activité phosphatase de SHP-1

Figure 27 : Expression protéique des protéines tyrosines phosphatases

Figure 28 : Expression génique des protéines tyrosines phosphatases

Figure 29 : Prolifération cellulaire chez des BAEC infectées avec une forme dominante-négative de SHP-1

Figure 30 : Migration cellulaire chez des BAEC infectées avec une forme dominante-négative de SHP-1

Figure 31 : Formation de tubules chez des BAEC infectées avec une forme dominante-négative de SHP-1

Figure 32 : Signalisation d'Akt et d'ERK chez des BAEC infectées avec une forme dominante-négative de SHP-1

Figure 33 : Modèle de souris transgénique avec délétion de SHP-1 inductible et spécifique aux cellules endothéliales

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Classification de la MAP selon Fontaine et Rutherford-Becker

Tableau 2 : Composition du tampon RIPA

Tableau 3 : Composition des gels de polyacrylamide

Tableau 4 : Liste des anticorps utilisés

Tableau 5 : Concentrations et volumes d'adénovirus utilisés

Tableau 6 : Conditions expérimentales pour la prolifération et migration cellulaire avec infection adénovirale

Tableau 7 : Préparation du MasterMix SYBR Green 2X

Tableau 8 : Séquences des amorces bovines utilisées pour les expériences de qPCR

Tableau 9 : Composition d'une réaction de qPCR

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABI	Indice tibio-brachial
ADH	Hormone anti-diurétique
ADP	Adénosine diphosphate
AGEs	Produits de glycation avancée
AGL	Acides gras libres
Akt/PKB	Akt/Proéine kinase B
Ang1/2/3/4	Angiopoïétine 1/2/3/4
AP-1	Protéine-1 activatrice
Apo B-100	Apolipoprotéine B-100
ApoE	Apolipoprotéine E
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATF	Facteur activateur transcriptionnel
ATP	Adénosine triphosphate
AVC	Accident vasculaire cérébral
BAD	Promoteur létal homologue associé aux cellules bêta du lymphome de type 2
BAEC	Cellules endothéliales d'aortes bovines
bFGF	Facteur de croissance du fibroblaste de base
CBP	Protéine de liaison à CREB
CHIP	C-terminal de la protéine d'interaction HSC70
CREB	Protéine de liaison à l'élément de réponse à l'AMP cyclique
CML _v	Cellule musculaire lisse vasculaire
CXCR4	Récepteur de chimiokine C-X-C de type 4
CXCL12	Chimiokine à motif C-X-C ligand 12
DAG	Diacylglycérol
DHAP	Dihydroxyacétone phosphate
DPP4	Dipeptidyl peptidase-4
DSPN	Polyneuropathies symétriques distales
DT1	Diabète type 1
DT2	Diabète type 2

EGF	Facteur de croissance épidermique
eNOS	Oxyde nitrique synthase endothéliale
EPC	Cellule progénitrice endothéliale
ERH	Élément de réponse à l'hypoxie
ERK	Kinase extracellulaire régulée par le signal
ET	Endothéline
FAK	Kinase d'adhésion focale
FBS	Sérum foetal bovin
FIH-1	Facteur inhibiteur de HIF-1
Flk-1	Kinase du foie foetal-1
Flt-1/4	Tyrosine kinase similaire au Fms-1/4
GAPDH	Glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase
GC	Guanylate cyclase
GFAT	Glutamine:fructose-6-phosphate amidotransférase
GFP	Protéine fluorescente verte
GIP	Peptide insulino-trope dépendant du glucose
GlcNAc-6-P	N-acétylglucosamine-6-phosphate
GLO1	Glyoxalase 1
GLP-1	Peptide-1 similaire au glucagon
GLUT2	Transporteur de glucose 2
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
GPCR	Récepteur couplé aux protéines G
GSH	Glutathion
GTP	Guanosine triphosphate
HIF-1	Facteur-1 inductible par l'hypoxie
HNF 1A/4A/1B	Facteur nucléaire hépatocytaire 1A/4A/1B
HRP	Peroxydase de raifort
HSP 40/70	Protéine de choc thermique 40/70
HSPG	Protéoglycanes à héparane sulfate
HUVEC	Cellule endothéliale de veine ombilicale humaine
ICAM-1	Molécule d'adhésion intercellulaire-1

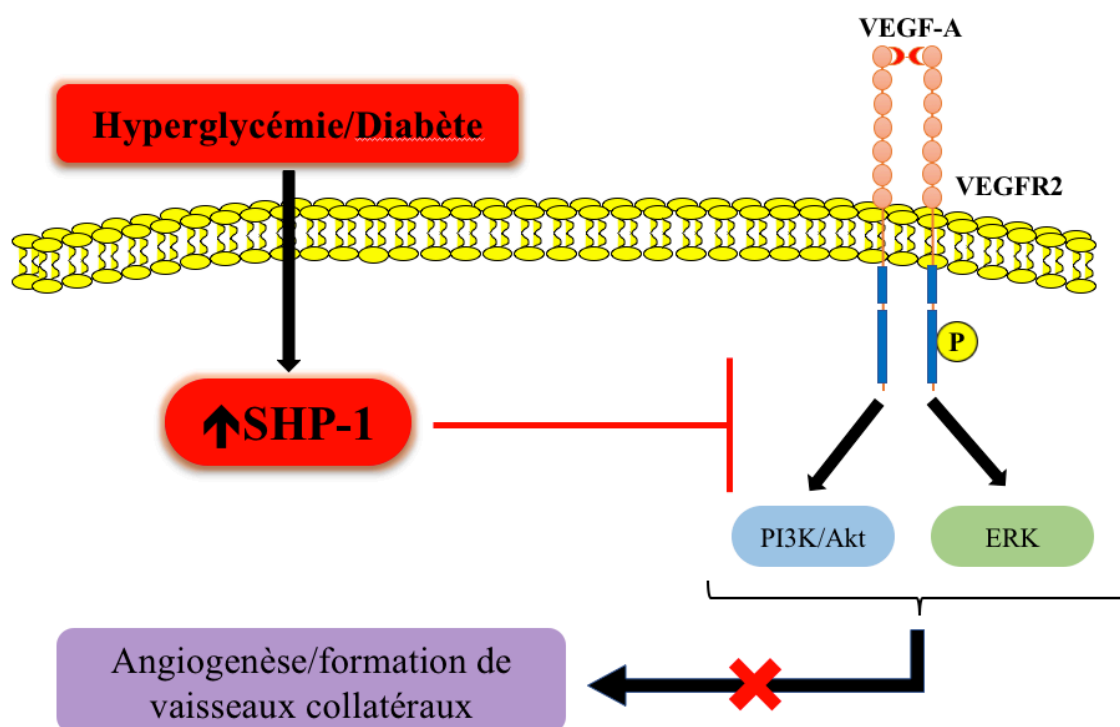
IDE	Enzyme de dégradation de l'insuline
IFN γ	Interféron gamma
IL-1	Interleukine-1
IL-1 β	Interleukine-1 bêta
IP ₃	Inositol triphosphate
IP ₃ R	Récepteur inositol 1,4,5-triphosphate
IPSCB	Indice de pression systolique cheville-bras
KDR	Récepteur avec domaine d'insertion de kinase
KO	Ablation
LADA	Diabète auto-immun latent de l'adulte
LDL	Lipoprotéine de basse densité
MAP	Maladie des artères périphériques
MAPK	Protéines kinases activées par un mitogène
MCP-1	Protéine chimiotactique des monocytes-1
M-CSFs	Facteurs de stimulation des colonies de macrophages
MGO	Méthylglyoxal
MLCK	Kinase des chaînes légères de la myosine
MLCP	Phosphatase des chaînes légères de la myosine
MMPs	Métalloprotéinases de la matrice
MODY 1/2/3/5	Diabète de la maturité apparaissant chez les jeunes 1/2/3/5
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NF- κ B	Facteur nucléaire amplificateur de chaîne légère kappa de cellules B activées
NRP 1/2	Neuropiline 1/2
NLS	Signal de localisation nucléaire
NO	Oxyde nitrique
OGT	O-linked bêta-N-acétylglucosamine transférase
PARP-1	Poly(ADP-ribose)polymérase-1
PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PDGFR	Récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes
PDH	Prolyl hydroxylase

PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PIP ₃	Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate
PKC	Protéine kinase C
PKG	Protéine kinase G
PLC	Phospholipase C
PLGF	Facteur de croissance placentaire
PP	Polypeptide pancréatique
PPAR- γ	Récepteur gamma activé par les proliférateurs de peroxysomes
PTP	Protéine tyrosine phosphatase
PTP1B	Protéine tyrosine phosphatase 1B
PTPN	Protéine tyrosine phosphatase de type non-récepteur
PTPR	Protéine tyrosine phosphatase de type récepteur
P/S	Pénicilline/streptomycine
qPCR	PCR quantitative
RAGEs	Récepteur des produits de glycation avancée
RDNS	Étude Rochester portant sur la neuropathie diabétique
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
RS	Réticulum sarcoplasmique
RTK	Récepteur tyrosine kinase
SDF-1	Facteur-1 dérivé des cellules stromales
SDH	Enzyme sorbitol déshydrogénase
SERCA	Calcium ATPase du réticulum sarcopasmique et endoplasmique
SGLT-2	Cotransporteur sodium-glucose-2
SH2	Homologie Src 2
SHP-1/2	Protéine tyrosine phosphatase contenant le domaine SH2-1/2
sFlt-1	Tyrosine kinase soluble similaire au fms-1
siRNA	Petit ARN interférent
SNS	Système nerveux sympathique
SRAA	Système rénine-angiotensine-aldostérone
STZ	Streptozotocine

TGF- β	Facteur de croissance transformant bêta
Tie 1/2	Tyrosine kinase avec domaines d'homologies Ig et EGF 1/2
TNF- α	Facteur de nécrose tumorale alpha
TP	Température pièce
UDP-GlcNAc	UDP-N-acétylglucosamine
VCAM-1	Molécule d'adhésion cellulaire vasculaire-1
VDCC	Canal calcique voltage-dépendant
VEGF	Facteur de croissance endothélial vasculaire
VEGFR	Récepteur du facteur de croissance endothélial vasculaire
VE-PTP	Protéine tyrosine phosphatase endothéliale vasculaire
VHL	Von Hippel-Lindau

HYPOTHÈSE/PROBLÉMATIQUE

La maladie des artères périphériques (MAP) est une complication macrovasculaire du diabète causée par un processus angiogénique défectueux entraînant un haut risque d'amputation du membre inférieur. La perte des effets angiogéniques du VEGF pourrait expliquer la dérégulation de l'angiogenèse chez les patients diabétiques. Notre laboratoire a rapporté une diminution de la phosphorylation de VEGFR2 dans le muscle ischémique des souris diabétiques, par rapport au muscle de souris non-diabétiques. Une corrélation a été observée entre la diminution de la phosphorylation de VEGFR2 et l'augmentation de l'expression de la protéine tyrosine phosphatase SHP-1, dans les muscles ischémiques des souris diabétiques. Ainsi, nous avons posé l'hypothèse qu'une augmentation de l'expression ou de l'activité de la protéine tyrosine phosphatase SHP-1 en hyperglycémie inhiberait la réponse des récepteurs aux facteurs de croissance en conditions hypoxiques, dont le VEGF, menant ainsi à une perturbation de l'angiogenèse.



INTRODUCTION

1.1 Le diabète : Mise en contexte

Le diabète est un désordre métabolique qui est caractérisé par une hyperglycémie prolongée en raison d'un défaut de la sécrétion d'insuline accompagné ou non d'un défaut de l'action de l'insuline. L'hyperglycémie prolongée mène au développement de complications vasculaires pouvant affecter plusieurs organes dont les vaisseaux sanguins, les nerfs, les reins et les yeux. Le risque de développer un accident vasculaire cérébral (AVC) et l'infarctus du myocarde est aussi augmenté. On parle de diabète lorsque la glycémie à jeun d'un patient est de 126 mg/dL (7,0 mmol/L) ou plus (Goldenberg et Punthakee, 2013). Les symptômes associés à l'hyperglycémie dans un contexte de diabète sont la perte de poids, la polyurie (urines abondantes), la polydipsie (soif excessive), la polyphagie (faim excessive), la vision embrouillée et la fatigue (Canadian Diabetes Association, 2017). La prévalence du diabète à l'échelle mondiale ne cesse d'augmenter et est passée de 4,7% à 8,5% chez l'adulte, depuis 1980. En 2014, 422 millions d'adultes étaient atteints du diabète, soit 314 millions de plus qu'en 1980. De plus, 1,5 millions de décès étaient causés par le diabète en 2012. Au Canada, les coûts des soins de santé liés directement au diabète et ses complications étaient de 3 milliards en 2015 (Association Canadienne du Diabète, 2015). Les patients diabétiques ont un taux d'amputation des membres inférieurs 10 à 20 fois plus élevé que la population non diabétique en raison des ulcérations des pieds qui s'infectent et dont la guérison est difficile (Organisation mondiale de la santé, 2016). Au Canada, 3 826 cas d'amputations ont été rapportées chez des patients diabétiques de 2011 à 2012. Le coût du traitement d'un ulcère du pied coûte environ 8 000 \$ et peut atteindre 17 000 \$ si l'ulcère s'infecte en raison du séjour hospitalier (Association Canadienne du Diabète, 2015).

1.2 Le désordre angiogénique dans le diabète

Plusieurs mécanismes ont été proposés (voir figure 1) pour expliquer la perte des phénomènes angiogéniques dans le diabète. Parmi ces mécanismes, on retrouve le stress oxydatif, la voie des polyols, la voie des produits de glycation avancée (AGEs), la voie des hexosamines et la voie de la PKC.

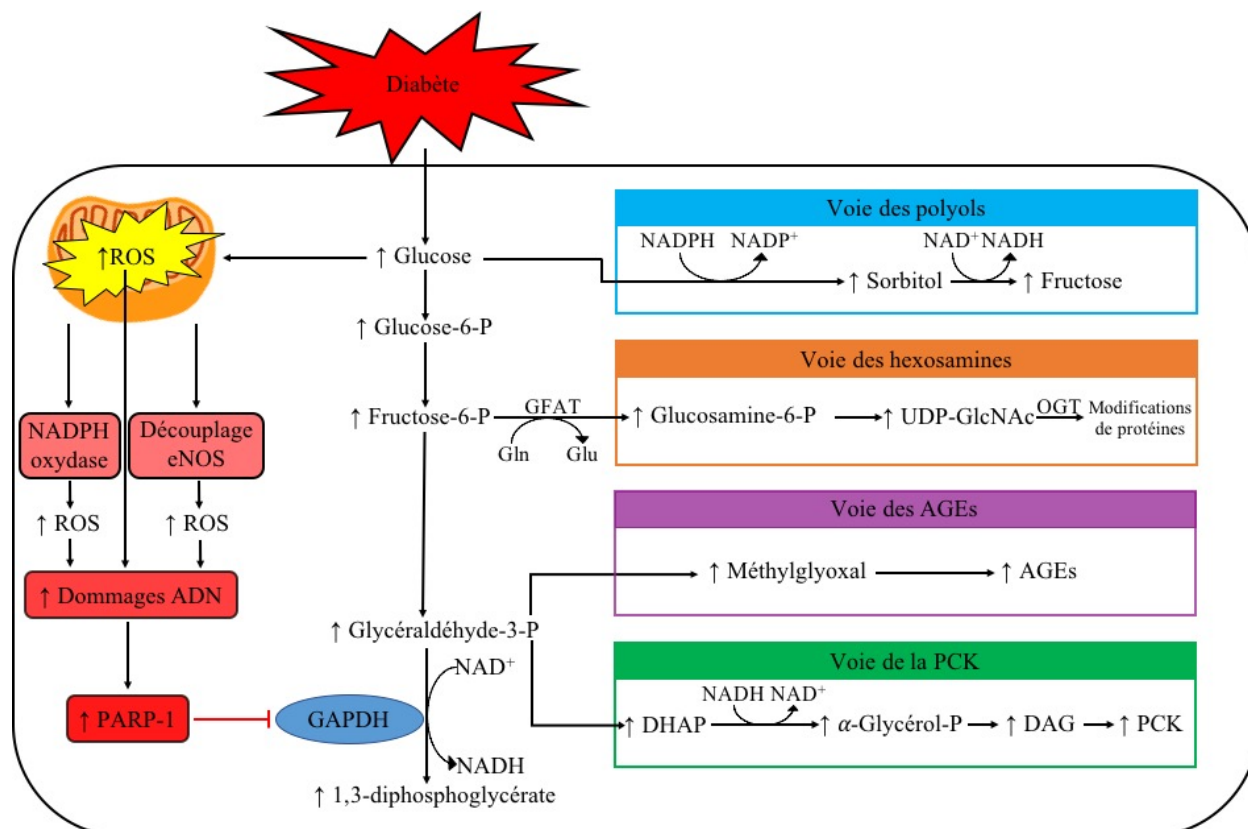


Figure 1 : Représentation schématique du désordre angiogénique dans le diabète

Les niveaux élevés de glucose, dans le diabète, vont mener à une augmentation des niveaux de glucose intracellulaires. Ces niveaux de glucose élevés vont augmenter la production de ROS mitochondriaux. Ces ROS vont découpler le eNOS et provoquer l'activation de la NADPH oxydase produisant encore plus de ROS. Ces ROS vont diffuser au noyau et induire des bris dans l'ADN ce qui active l'enzyme PARP-1 qui provoque l'inhibition de la GAPDH. Il s'en suit l'accumulation d'intermédiaires de la glycolyse. Tout d'abord, il y aura génération de sorbitol à partir du glucose dans la voie des polyols. Cette réaction nécessite la consommation de NADPH, un cofacteur nécessaire pour régénérer le glutathion, contribuant à exacerber le stress oxydatif. Ensuite, l'augmentation des niveaux de fructose-6-phosphate provoque l'augmentation de UDP-GlcNAc, lequel sera utilisé comme substrat par l'enzyme OGT provoquant des modifications néfastes pour les protéines. L'accumulation de glyceraldéhyde-3-P provoque l'augmentation des niveaux de méthylglyoxal qui augmente les AGEs, contribuant à endommager les cellules. Finalement, le glyceraldéhyde-3-P est converti en DAG, lequel active la PKC qui contribue à activer des voies intracellulaires dommageables (adapté de Brownlee, 2001; Shah et Brownlee, 2016).

1.2.1 Le stress oxydatif

Le stress oxydatif serait à l'origine des 4 mécanismes impliqués dans le désordre angiogénique qui seront décrits de la section 1.2.2 à 1.2.5 (voir figure 1). La dysfonction des cellules vasculaires dans le diabète serait causée par le flux élevé de glucose pénétrant la cellule. Ces hauts niveaux de glucose mèneraient à une surproduction d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) par la chaîne de transport d'électrons mitochondriale, lesquelles contribueraient à amplifier davantage la production de ROS en activant la NADPH oxydase et aussi en découplant la eNOS (Shah et Brownlee, 2016). Les ROS vont diffuser dans le noyau de la cellule et causer des bris double-brins dans l'ADN. Ces bris activeront des enzymes de réparation de l'ADN, notamment la poly(ADP-ribose) polymérase 1 (PARP-1). L'activation de PARP-1 va provoquer la polyADP-ribosylation de la GAPDH, une enzyme importante dans la glycolyse, inhibant ainsi son activité enzymatique. Il y a alors accumulation d'intermédiaires de la glycolyse qui sont à l'origine des 4 mécanismes du désordre angiogénique. L'accumulation de glucose va provoquer une augmentation de la voie des polyols. L'accumulation de fructose-6-phosphate va favoriser l'activité de la voie des hexosamines. Il y aura aussi accumulation de glycéraldéhyde-3-phosphate qui sera à l'origine de l'augmentation de la voie des AGEs et de la PKC (Brownlee, 2001; Giacco et Brownlee, 2010; Schaffer et al., 2012).

1.2.2 La voie des polyols

L'aldose réductase est le premier enzyme de la voie des polyols. Cette enzyme est responsable de catalyser la réduction à l'aide du NADPH de composés carbonylés, incluant le glucose, en leurs alcools respectifs. En condition non-diabétique, l'aldose réductase a peu d'affinité avec le glucose. Par contre, en milieu hyperglycémique, les concentrations intracellulaires de glucose sont augmentées favorisant alors la conversion enzymatique du glucose en sorbitol. Cette réaction est accompagnée de la baisse des niveaux NADPH. Par la suite, le sorbitol est oxydé en fructose par l'enzyme sorbitol déshydrogénase (SDH) qui réduit un NAD^+ en NADH. L'hyperactivité de cette voie serait dommageable pour les cellules exposées en concentrations élevées de glucose en raison de la consommation de NADPH. Puisque le NADPH est le cofacteur de l'enzyme glutathion réductase et qu'il est requis pour régénérer le glutathion (GSH), un antioxydant, ceci pourrait contribuer à exacerber le stress oxydatif intracellulaire (Brownlee, 2001; Giacco et Brownlee, 2010; Shah et Brownlee, 2016). La voie des polyols est impliquée dans les complications cardiovasculaires du diabète. La surexpression de l'aldose réductase humaine dans des souris

diabétiques déficientes pour l'apolipoprotéine E (ApoE) a accéléré le développement de l'athérosclérose, un phénomène prévenu par l'inhibition de l'enzyme (Vedantham et al., 2011). Une autre étude a montré des résultats inverses chez des souris ApoE déficientes, un modèle murin qui développe une hypercholestérolémie sévère sous diète grasse (McNeill et al., 2010). En effet, l'inhibition ou l'invalidation de l'enzyme aldose réductase dans des souris diabétiques de type 1 résulte en une augmentation de la taille des lésions athérosclérotiques précoces (Srivastava et al., 2009).

1.2.3 La voie des hexosamines

L'hyperglycémie, en endommageant les cellules vasculaires, va causer une augmentation du flux du fructose-6-phosphate en provenance de la glycolyse dans la voie des hexosamines. Le fructose-6-phosphate est ensuite converti en glucosamine-6-phosphate par l'enzyme limitante glutamine:fructose-6-phosphate amidotransférase (GFAT). La glucosamine-6-phosphate est ensuite convertie en *N*-acétylglucosamine-6-phosphate (GlcNAc-6-P) puis en UDP-*N*-acétylglucosamine (UDP-GlcNAc). L'enzyme *O*-linked β -*N*-acétylglucosamine transférase (OGT) utilisera comme substrat le UDP-GlcNAc afin de transférer des *N*-acétylglucosamine sur des résidus sérine et thréonine de protéines cytoplasmiques et nucléaires (Giacco et Brownlee, 2010; Shah et Brownlee, 2016). De plus, la eNOS serait inhibée par des modifications en sérine 1177 par l'enzyme OGT, dans des cellules BAECs exposées à des concentrations élevées de glucose (Du et al., 2001). Des modifications par l'enzyme OGT de la protéine A20 dans des CE, une protéine anti-inflammatoire responsable de l'inhibition du facteur nucléaire amplificateur de chaîne légère kappa de cellules B activées (NF- κ B), contribueraient à l'ubiquitination et la dégradation au protéasome de cette dernière favorisant le développement de l'athérosclérose dans le diabète (Shrikhande et al., 2010). Finalement, l'exposition des BAECs à des concentrations élevées de glucose favoriserait la modification post-traductionnelle par l'OGT du facteur de transcription Sp1, provoquant l'augmentation de la transcription du TGF- β contribuant à la pathogenèse des complications du diabète (Du et al., 2000).

1.2.4 La voie des AGEs

Les produits de glycation avancée (AGEs) proviennent de la réaction non-enzymatique entre le glucose ou ses dérivés et des lipides et/ou protéines (Shah et Brownlee, 2016). La production intracellulaire des précurseurs des AGEs peut endommager les cellules selon 3 mécanismes

distincts. Tout d'abord, les AGEs peuvent altérer la fonction des protéines intracellulaires en les modifiant. De plus, les composantes de la matrice extracellulaire modifiées par les précurseurs des AGE peuvent interagir avec d'autres composantes de la matrice de façon anormale ou avec des récepteurs de la matrice comme les intégrines, exprimés à la surface cellulaire. De surcroît, les protéines modifiées par les AGEs peuvent lier les récepteurs des AGEs (RAGEs) sur la surface des cellules incluant les macrophages, les CE vasculaires et les CMLv induisant alors la production de ROS (Brownlee, 2001; Giacco et Brownlee, 2010; Shah et Brownlee, 2016). Les ROS auront comme effet d'activer le facteur de transcription nucléaire NF- κ B menant à des changements nuisibles dans l'expression de gènes (Goldin et al., 2006). Le méthylglyoxal (MGO) est le précurseur des AGEs le plus abondant dans les tissus diabétiques (Thornalley et al., 2003). Il a été montré que le MGO augmente l'expression d'Angiopoïétine 2 (Ang2) dans des CE les rendant plus sensibles aux effets pro-inflammatoires du facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α) (Giacco et Brownlee, 2010). La dysfonction endothéliale est en partie causée par une incapacité du facteur-1 alpha inductible par l'hypoxie (HIF-1 α) à induire l'expression de eNOS, SDF-1, CXCR4 et VEGF en réponse à l'hypoxie en raison de l'hyperglycémie (Bento et Pereira, 2011) tel que discuté à la section 1.7.3. La surexpression de *GLO1* codant pour la glyoxalase 1, une enzyme qui détoxifie le MGO, a permis d'empêcher la réduction de l'expression de CXCR4 et de eNOS dans des EPCs exposées en concentrations élevées de glucose et en hypoxie (Ceradini et al., 2008). Il a été montré que le MGO provoque une baisse de la sécrétion du VEGF et une augmentation de la sécrétion de l'Ang2 dans des cellules endothéliales rétinales mises en hypoxie, un effet prévenu par la surexpression de *GLO1* (Bento et al., 2010). La surexpression de *GLO1* a permis de prévenir la déstabilisation de HIF-1 α en condition élevée de glucose et faible en oxygène (Bento et al., 2010). Une étude effectuée chez des souris diabétiques a montré que l'inhibition de la formation des AGEs permet de rétablir l'angiogenèse dans le muscle ischémique (Tamarat et al., 2003). La surexpression de l'enzyme *GLO1* dans les cellules de la moelle osseuse a permis de rétablir la fonction de ces cellules et la néovascularisation du muscle ischémique chez des souris diabétiques (Vulesevic et al., 2014).

1.2.5 La voie de la protéine kinase C (PKC)

Les PKC sont des sérine/thréonine kinases qui sont impliquées dans plusieurs fonctions cellulaires et également dans la régulation de la transduction de signaux. Le diabète mène à une augmentation

des niveaux de diacylglycérol (DAG) en raison de l'augmentation des niveaux de dihydroxyacétone phosphate (DHAP), un intermédiaire de la glycolyse qui est ensuite réduit en glycérol-3-phosphate. Le glycérol-3-phosphate augmente la synthèse *de novo* de DAG (Geraldès et King, 2010). Les niveaux de DAG étaient augmentés dans des CE cultivées en concentrations élevées de glucose (Inoguchi et al., 1992). L'hyperglycémie active principalement les isoformes PCK- β et PKC- δ (Giaccio et Brownlee, 2010; Shah et Brownlee, 2016). En hyperglycémie, la PKC serait responsable d'inhiber la communication intercellulaire par les jonctions gap dans les CE, un effet prévenu par la staurosporine, un inhibiteur de PKC (Inoguchi et al., 1995). L'expression de la eNOS est réduite dans des CE exposées à des concentrations élevées de glucose ce qui contribue à réduire les niveaux de NO (Ding et al., 2000), un effet prévenu par l'inhibition de la PKC (Cosentino et al., 2003). PCK- β serait impliqué dans le développement de l'athérosclérose. Notamment, l'hyperglycémie active cet isoforme favorisant l'inflammation vasculaire et l'accélération de l'athérosclérose dans un modèle murin diabétique *ApoE*^{-/-} en raison de l'augmentation de médiateurs inflammatoires (Kong et al., 2013). Une autre étude réalisée dans des souris diabétiques *ApoE*^{-/-} a montré que l'inhibition spécifique de PCK- β permettait de réduire significativement le développement de l'athérosclérose et la complexité de la plaque par la diminution de l'infiltration de macrophages et du contenu en ester de cholestérol (Durrpès et al., 2015). La délétion de PCK- β dans des souris *ApoE*^{-/-} a permis de ralentir le développement de l'athérosclérose (Harja et al., 2009). L'inhibition de PCK- β II dans des CE a permis de rétablir la migration cellulaire en concentrations élevées de glucose et d'augmenter les niveaux de HIF-1 α (Gadad et al., 2013). La PKC- δ causerait l'activation de protéine tyrosine phosphatase contenant le domaine SH2-1 (SHP-1) dans des péricytes rétinaux exposés à l'hyperglycémie, provoquant l'inhibition du PDGFR- β ainsi que leur apoptose contribuant à la pathogenèse de la rétinopathie diabétique (Geraldès et al., 2009). Il a également été montré dans le muscle ischémique d'un modèle murin diabétique que l'hyperglycémie active PKC- δ provoquant une augmentation de l'expression de SHP-1 inhibant l'activation des récepteurs VEGFR2 et PDGFR- β contribuant à la perte des phénomènes angiogéniques en réponse à l'ischémie (Lizotte et al., 2013). Cette étude montre l'implication de SHP-1 dans le développement de la MAP.

1.3 Les types de diabète

1.3.1 Physiologie du pancréas : fonctions et régulations

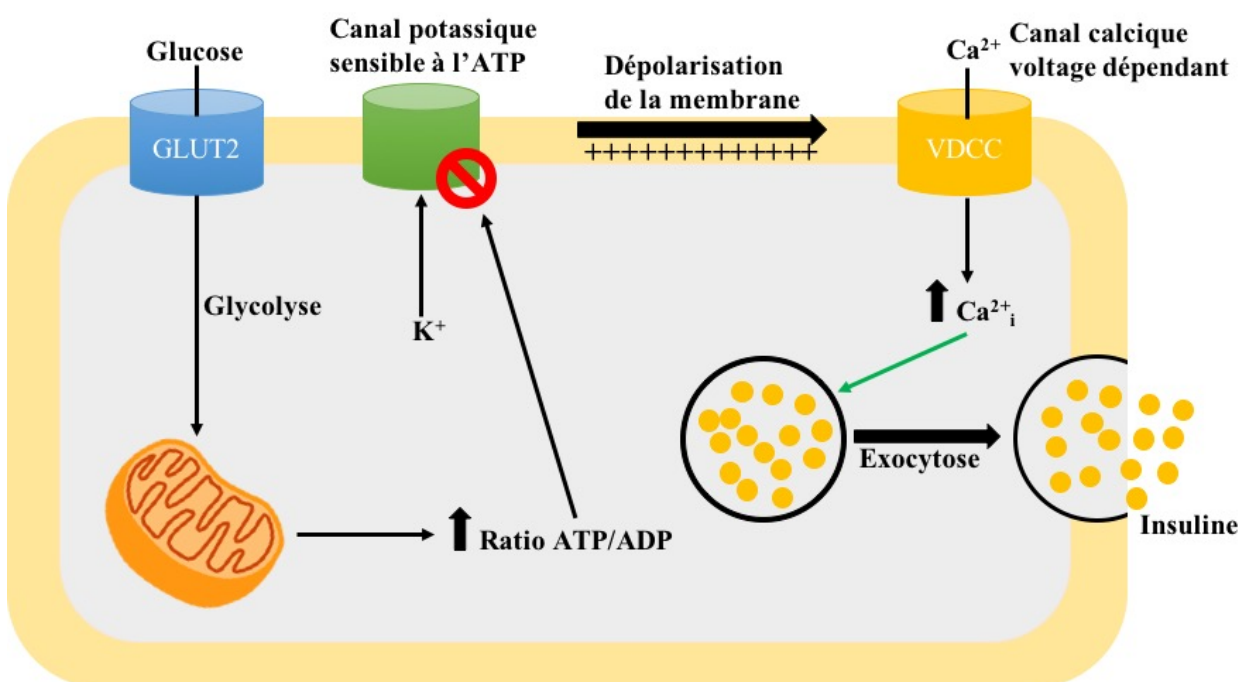


Figure 2 : Mécanisme de libération de l'insuline dans les cellules bêta du pancréas

L'entrée de glucose par le transporteur GLUT2 dans la cellule bêta augmente la production d'ATP issue de la glycolyse. L'augmentation du ratio ATP/ADP bloque alors la sortie de potassium par le canal potassique ATP-dépendant ce qui dépolarise la membrane. Ceci active les canaux calciques voltage dépendant permettant alors l'entrée de calcium dans la cellule. La hausse des concentrations de calcium intracellulaire mène à l'exocytose des vésicules contenant l'insuline en circulation sanguine (adapté de Röder et al., 2016).

Avant d'aborder les types de diabète, il est important de connaître et de comprendre la physiologie du pancréas. Le pancréas est un organe qui possède une fonction exocrine et une endocrine. Le pancréas exocrine est composé de cellules acinaires responsables de la sécrétion de sucs pancréatiques contenant diverses enzymes digestives dont la lipase pancréatique, le trypsinogène et l'amylase dans le canal pancréatique principal et accessoire. Le pancréas endocrine, comme son nom l'indique, relâche des hormones directement dans la circulation sanguine. Le pancréas endocrine contient cinq types de cellules regroupées formant des îlots de Langerhans situés dans le pancréas exocrine. Ces îlots représentent environ 1 à 2 % du pancréas (Röder et al., 2016). Les

îlots de Langerhans contiennent les cellules α qui sont responsables de la production de glucagon (Brissova et al., 2005). Le glucagon est une hormone qui augmente la production hépatique de glucose augmentant alors les niveaux de glucose sanguin pour prévenir une hypoglycémie (Göke, 2008). Les cellules γ sont responsables de la production du polypeptide pancréatique (PP) qui a pour effet de réguler l'activité sécrétoire du pancréas endocrine et exocrine (Katsuura et al., 2002). Les cellules δ , quant à elles, produisent la somatostatine qui a pour effet d'inhiber la relâche de glucagon et d'insuline (Hauge-Evans et al., 2009). De plus, les cellules ϵ sécrètent la ghréline, une hormone impliquée dans la régulation de la prise alimentaire et dans la régulation de la balance énergétique (Wierup et al., 2002). Finalement, les cellules β produisent l'amyline, le peptide-C et l'insuline (Brissova et al., 2005). L'insuline est produite à partir de la pré-pro-insuline dans la cellule β . Une fois dans le réticulum endoplasmique, la pré-pro-insuline est convertie en pro-insuline suite au clivage du peptide signal par les peptidases de type signal. Lors de son passage dans l'appareil de Golgi, la pro-insuline est clivée en insuline bioactive et en peptide-C. Ces deux molécules sont stockés ensemble dans des vésicules sécrétoires, donc relâchés en circulation en même temps (Steiner et al., 2009). L'insuline a pour effet de réduire les niveaux de glucose sanguin (Göke, 2008). La sécrétion d'insuline s'effectue via un mécanisme dépendant du ratio ATP/ADP dans la cellule β (Figure 1). Suite à la prise alimentaire, le glucose entre dans la cellule β par le transporteur de glucose 2 (*Glucose transporter 2* ; GLUT2) situé à la membrane. Le glucose subira ensuite le processus de glycolyse, une voie métabolique qui mène à la synthèse d'adénosine triphosphate (ATP). Cette hausse d'ATP résulte en une hausse du ratio ATP/ADP menant alors à la fermeture des canaux potassiques sensibles à l'ATP (K_{ATP} -channels) (Noma, 1983). La fermeture des canaux potassiques ATP-dépendants empêche la sortie de potassium hors de la cellule β ce qui entraîne la dépolarisation de la membrane. Cette dépolarisation va ensuite provoquer l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendant (VDCC) menant à une augmentation de calcium intracellulaire. L'augmentation des concentrations de calcium intracellulaire provoquera l'exocytose des vésicules sécrétoires et la relâche d'insuline en circulation sanguine (Henquin, 2000). L'insuline augmente la capture du glucose par le muscle et le tissu adipeux et inhibe la production hépatique de glucose. L'insuline stimule la formation de glycogène dans le foie et les muscles et stimule la formation de triglycérides dans le foie. L'action de l'insuline sur le tissu adipeux favorise le stockage des graisses en stimulant la lipogenèse (Saltiel et Kahn, 2001). L'insuline a une demi-vie plasmatique de quatre à six minutes et est donc

rapidement dégradée suivant sa relâche par l'enzyme de dégradation de l'insuline (IDE) (Duckworth et al., 1998).

1.3.2 Le diabète de type 1

Le diabète de type 1 (DT1) est une pathologie caractérisée par la destruction auto-immune des cellules β du pancréas. La sécrétion d'auto-anticorps contre les îlots de Langerhans, l'insuline, la carboxylase de l'acide glutamique, la phosphatase IA-2 et le transporteur de zinc serait responsable de la destruction des cellules β du pancréas. Certaines études ont montré que la présence de trois ou quatre de ces auto-anticorps ne garantit pas nécessairement le développement du DT1, mais le risque augmente de 60-100% sur une période de 5 à 10 années (Knip et al., 2005). Le DT1 est une maladie chronique qui se manifeste lors de l'enfance, soit vers l'âge de 5 à 7 ans et au début de la puberté. Cette pathologie est plus commune chez les hommes (Atkinson et al., 2014). L'incidence annuelle du DT1 est mondialement en augmentation de 2,3 % par année (Simmons, 2015). Bien que le DT1 soit une maladie diagnostiquée majoritairement lors de l'enfance, environ le quart des cas peuvent être diagnostiqués chez des adultes. Ceci pourrait s'expliquer par le fait qu'un mauvais diagnostic serait posé. En effet, on estime que jusqu'à 15% des patients adultes auraient reçu un diagnostic de diabète de type 2 (DT2) alors qu'ils souffraient en fait du DT1. Ainsi, une nouvelle classification a été établie. Il s'agit diabète auto-immun latent de l'adulte (LADA) (Atkinson, 2012). Les raisons du développement du DT1 demeurent à ce jour encore nébuleuses. Le développement du DT1 semble avoir une composante à la fois génétique et environnementale. Les allèles DR4/DQ8 ou DR3/DQ2 des gènes de classe deux situés dans le complexe HLA (antigènes leucocytaires humains) du chromosome 6 contribueraient fortement au risque génétique de développer le DT1 et seraient présents dans 90% des gens qui ont le diabète de type 1. Il y a aussi d'autres gènes qui sont impliqués dans le développement du DT1. L'allèle DQ6, quant à elle, favoriserait une protection contre le développement du DT1. De plus, des polymorphismes dans le gène de l'insuline pourraient protéger ou favoriser le développement du DT1. Par ailleurs, un polymorphisme d'un seul nucléotide dans le gène de la protéine tyrosine phosphatase de type non-récepteur 22 (PTPN22) pourrait aussi induire le développement du DT1. L'environnement aurait un rôle important dans le développement du DT1 puisque la génétique à elle seule ne mène pas directement au développement du DT1. De ce fait, il faut un ou plusieurs facteurs déclencheurs environnementaux qui vont provoquer le processus d'auto-immunité chez des individus ayant des

prédispositions génétiques. L'alimentation et les infections virales par les entérovirus et les rotavirus sont des facteurs déclencheurs environnementaux (Simmons, 2015). Le DT1 demeure à ce jour une maladie incurable et se traite uniquement par un contrôle glycémique à l'aide de l'injection d'insuline et d'une diète appropriée.

1.3.3 *Le diabète de type 2*

L'obésité croissante a provoqué une augmentation du diabète de type 2 (DT2) mondialement. Le DT2 diffère du DT1 puisqu'il n'implique pas la destruction des îlots de Langerhans et que son développement peut être prévenu. En effet, il a été montré que les patients atteints de DT2 avaient un épuisement des cellules β à produire de l'insuline et ces cellules ne répondaient pas bien aux taux de glucose. De plus il a été montré que ces individus ne répondaient pas bien à l'insuline. Cette diminution de la réponse à l'insuline est appelée résistance à l'insuline. De plus, s'ajoute à cette résistance à l'insuline une surproduction de glucose par le foie et une réduction de la capture du glucose par les muscles et le tissu adipeux. Il en résulte donc une augmentation des taux plasmatiques de glucose. De plus, il existe une boucle de rétroaction entre les cellules β et les tissus sensibles à l'insuline afin d'assurer un contrôle des niveaux de glucose. De ce fait, l'insuline relâchée par les cellules β stimule la capture de glucose, d'acides aminés et d'acides gras par les tissus qui sont sensibles à celle-ci. Ces tissus vont en quelque sorte retourner de l'information aux cellules β en rapport à leurs besoins d'insuline avec un médiateur demeurant inconnu à ce jour. Lorsque la résistance à l'insuline se développe dans les tissus sensibles à l'insuline, il y a rétroaction positive aux cellules β afin qu'elles augmentent leur libération d'insuline pour maintenir un contrôle glycémique normal. Cependant, lorsque les cellules β sont incapables d'augmenter les taux d'insuline relâchés en présence de résistance à l'insuline, il en résulte une augmentation des glycémies. Plus la dysfonction des cellules β s'accroît, plus les glycémies sont élevées et on parle ainsi de DT2 (Kahn et al., 2014).

L'insuline a des effets sur le métabolisme des acides gras. En effet, elle agit en inhibant l'enzyme lipase hormono-sensible. Ceci empêche donc la relâche des acides gras libres (AGL) en agissant sur les adipocytes. Cependant, les adipocytes des patients atteints du DT2 sont résistants aux effets inhibiteurs de l'insuline sur la lipolyse. Ainsi, les AGL plasmatiques sont élevés. Ceux-ci peuvent s'accumuler dans certains tissus et causer un phénomène connu sous le nom de lipotoxicité (DeFronzo, 2004).

L'environnement et les gènes sont des facteurs impliqués dans la résistance et la dysfonction des cellules β . Le gène du récepteur gamma activé par les proliférateurs de peroxyssomes (PPAR- γ) a été le premier gène identifié et lié au DT2. Il y a également au moins 33 locis qui ont été liés au DT2. La nutrition a aussi un impact sur le développement du DT2. L'augmentation de l'apport calorique et la diminution de la dépense énergétique sont des facteurs environnementaux importants. La composition des aliments, l'apport en lipides et gras saturés ont des impacts importants sur le développement de l'obésité, la résistance à l'insuline, la dysfonction des cellules β et la tolérance au glucose. L'âge joue également un rôle, plus on est âgés plus notre tolérance au glucose diminue. S'ajoute à cela l'environnement utérin qui pourrait induire des changements épigénétiques et induire le développement du DT2 (Kahn et al., 2014).

Le traitement du DT2 repose sur la perte de poids, les saines habitudes de vie et le contrôle glycémique grâce à des agents pharmacologiques. Parmi ces molécules, la metformine est le traitement initial de choix et diminue la gluconéogenèse hépatique, ce qui diminue la libération de glucose par le foie et diminue la résistance périphérique à l'insuline. Il existe d'autres traitements dont les inhibiteurs de l'alpha-glucosidase, les inhibiteurs de la DPP-4, des agonistes du récepteur au GLP-1, l'insuline, le méglitinide, les sulfonyles, les inhibiteurs du cotransporteur sodium-glucose-2 (SGLT-2), les thiazolidinediones et les médicaments anti-obésité dont l'orlistat. Toutefois, ces médicaments comportent beaucoup d'effets secondaires (Booth et al., 2016).

1.3.3.1 Incrétines et diabète de type 2

Le système digestif produit des incrétones qui stimulent la sécrétion d'insuline en réponse à l'élévation de la glycémie. Les deux principales incrétones produites sont le peptide insulino-trope dépendant du glucose (GIP) et le peptide-1 similaire au glucagon (GLP-1). Le GLP-1 est le plus important et il agit sur les cellules β en stimulant la sécrétion d'insuline et sur les cellules α en inhibant la sécrétion de glucagon. Les niveaux de GLP-1 plasmatiques ne varient généralement pas chez les patients atteints de DT2 versus les patients sains. Par contre, les cellules β des patients atteints de DT2 ne répondent pas bien au GLP-1 ce qui s'ajoute à la déficience des cellules β (Kahn et al., 2014).

1.3.4 Autres types de diabète

1.3.4.1 Le diabète gestationnel

Il s'agit d'une forme de diabète qui survient au cours de la grossesse, particulièrement en fin de grossesse. En temps normal, au cours de la grossesse, une réduction de la sensibilité à l'insuline est observée en raison des facteurs placentaires et des hormones dont l'œstrogène et la progestérone. Cette réduction de la sensibilité à l'insuline sera alors compensée par une augmentation de la sécrétion de l'insuline pour maintenir des niveaux de glucose normaux. Le diabète gestationnel apparaît lorsque les cellules β du pancréas ne peuvent compenser ce besoin en insuline. De plus, les femmes qui développent le diabète gestationnel seraient résistantes à l'insuline avant la grossesse. Les femmes atteintes du diabète gestationnel auraient beaucoup plus de risque de développer le DT2 et de souffrir d'une prééclampsie. Cette dernière n'est pas sans risque pour le fœtus. En effet, les complications pour le fœtus incluent les malformations lors de la grossesse en raison de l'hyperglycémie dont la macrosomie. De plus, le nouveau-né est susceptible de développer le DT2 et de souffrir d'embonpoint au cours de son développement. Le contrôle du diabète de grossesse est important pour éviter les complications possibles pour la mère et le fœtus et ce contrôle repose sur des changements au niveau de l'hygiène de vie en présence ou absence de metformine et d'insuline au besoin. Ces traitements n'ont pas montré d'impact significatifs sur le développement ou la santé du fœtus (Baz et al., 2016).

1.3.4.2 Formes monogéniques du diabète

Le diabète de la maturité apparaissant chez les jeunes (MODY) est causé par une forme autosomique dominante non insulino-dépendante du diabète. Le MODY est héréditaire est généralement présent lors de l'adolescence ou chez les jeunes adultes avant l'âge de 25 ans (Mcdonald et al., 2011; Owen et al., 2003). Il constitue pour environ 1-2% des cas de diabète et est malheureusement souvent confondu pour le DT1 ou le DT2 (Anik et al., 2015). Plusieurs mutations dans différents gènes sont à l'origine du MODY. En effet, on retrouve des mutations dans le gène de la glucokinase (MODY2) qui causent une hyperglycémie légère et asymptomatique (Anik et al., 2015; Osbak et al., 2009). Les mutations dans le gène du facteur nucléaire hépatocytaire (HNF) 1A/4A (MODY3 et MODY1) causent une dysfonction progressive des cellules β du pancréas menant potentiellement à des complications microvasculaires (Anik et al., 2015). Aucun traitement n'est nécessaire pour les patients atteints de MODY2 (Osbak et al., 2009).

Les sulfonylurées sont indiquées dans le traitement du MODY3 (Kavvoura et Owen, 2011) et MODY1 (Anik et al., 2015), mais une absence de réponse à ce traitement pourrait apparaître après 3 à 25 ans d'utilisation. Dans ce cas, l'insuline est indiquée (Fajans et Brown, 1993). Il existe le MODY5 qui est caractérisé par une mutation dans le gène HNF1B. Cette mutation engendre une agénésie du pancréas, des anomalies rénales, des malformations de l'appareil génital et des dysfonctions hépatiques (Anik et al., 2015). Le traitement du MODY5 repose sur l'utilisation d'insuline (McDonald et al., 2013). Le diagnostic moléculaire précis est de mise pour attribuer au patient le bon traitement et dépister rapidement la maladie auprès d'une famille asymptomatique (Anik et al., 2015).

1.4 Les complications vasculaires du diabète

Le diabète engendre plusieurs complications vasculaires en raison des taux élevés de glucose. Parmi ces complications vasculaires, on note les complications des petits vaisseaux dites microvasculaires. Elles incluent la néphropathie diabétique, la rétinopathie diabétique et les neuropathies diabétiques. Les complications des gros vaisseaux, dites macrovasculaires, incluent les complications cardiovasculaires (AVC, infarctus du myocarde), l'athérosclérose et la maladie des artères périphériques. L'athérosclérose et la maladie des artères périphériques et la neuropathie diabétique seront discutés dans ce mémoire.

1.4.1 La vascularisation du membre inférieur

Avant d'aborder les complications vasculaires du diabète, il est important de comprendre la vascularisation du membre inférieur. La vascularisation du membre inférieur débute d'abord au niveau de l'aorte abdominale. Tel que le montre la figure 3, l'aorte abdominale se divise en deux artères iliaques communes. Chaque artère iliaque commune donnera une artère iliaque externe et interne. Sous le ligament inguinal, l'artère iliaque externe devient l'artère fémorale qui irrigue les régions antérieures et antéro-médiales de la cuisse. L'artère fémorale profonde donne des artères perforantes qui vont traverser le muscle grand adducteur et contourner le fémur pour irriguer les muscles des parties médiales, postérieurs et latérales de la loge antérieure de la cuisse. L'artère fémorale entre ensuite dans le canal de l'adducteur et passe dans le hiatus tendineux de l'adducteur. L'artère fémorale devient alors l'artère poplitée qui est maintenant postérieure. Elle est située au niveau de la fosse poplitée. L'artère poplitée donne des artères supérieures, moyennes et inférieures qui irriguent les faces latérales et médiales du genou. Ensuite, l'artère tibiale antérieure

en provenance de l'artère poplitée passe la loge antérieure de la jambe en traversant un hiatus dans la partie supérieure de la membrane interosseuse, entre le tibia et le fibula. Cette artère descend le long de la membrane interosseuse et irrigue la loge antérieure de la jambe et devient l'artère dorsale du pied qui est responsable de l'irrigation des muscles du dos du pied. Postérieurement, l'artère poplitée donne l'artère tibiale postérieure qui parcourt et irrigue la loge postérieure de la jambe et se termine en artère plantaire médiale et latérale. L'artère tibiale postérieure donne aussi l'artère fibulaire qui descend le long de la loge postérieure de la jambe et irrigue cette dernière. Toutes les artères du membre inférieur sont susceptibles d'être touchées par l'athérosclérose (Gilroy et al., 2010; Moore et Dalley, 2006).

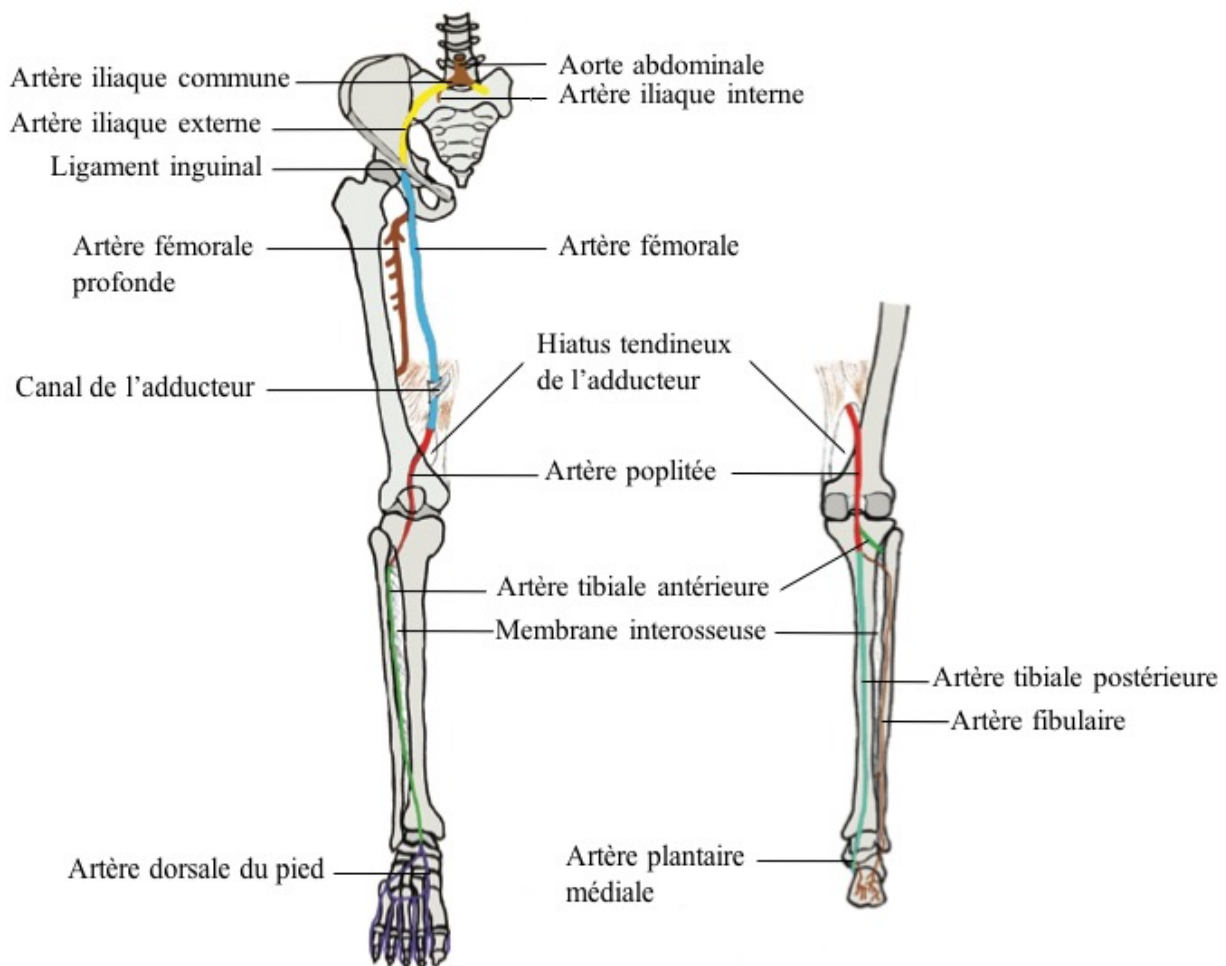


Figure 3 : Représentation schématique de la vascularisation du membre inférieur

Représentation des principales artères responsables de l'irrigation du membre inférieur. L'aorte abdominale donne les artères iliaques communes qui donnent les artères iliaques externe et interne. Sous le ligament inguinal l'artère iliaque externe donne l'artère fémorale. Les différentes branches issues de l'artère fémorale de proximal à distal sont représentées sur le schéma (adapté de Gilroy et al., 2010).

1.4.2 L'athérosclérose

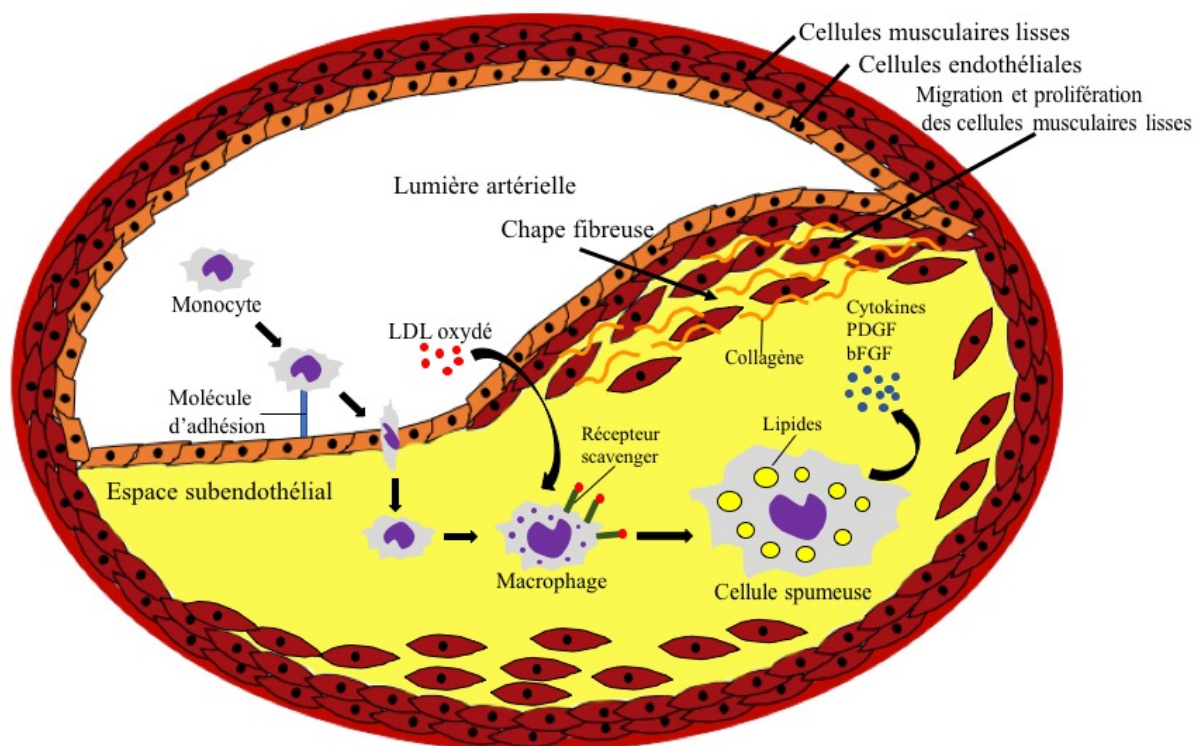


Figure 4 : Représentation schématique du mécanisme de l'athérosclérose dans une artère

Les monocytes pénètrent dans l'espace subendothélial en raison des molécules d'adhésion et se différencient en macrophages une fois l'endothélium traversé. Les monocytes deviendront des cellules spumeuses en se gorgeant de LDL oxydés. Les cellules spumeuses vont sécréter des facteurs inflammatoires dont les cytokines et des facteurs de croissance dont le PDGF et le bFGF qui vont favoriser la migration et prolifération des cellules musculaires lisses dans l'espace subendothélial. Les cellules musculaires lisses vont sécréter du collagène ce qui provoquera la formation de la chape fibreuse et ultimement la réduction de la lumière artérielle (adapté de Zeadin et al., 2013).

L'athérosclérose est une cause importante d'accident vasculaire cérébral (AVC) et d'angine ou d'infarctus du myocarde. L'athérosclérose est une maladie caractérisée par l'accumulation de lipides à l'intérieur des artères formant ainsi une plaque. Au fil du temps, cette plaque augmente en taille ce qui diminue davantage la lumière artérielle limitant ainsi l'apport sanguin aux tissus et organes irrigués par l'artère correspondante, condition appelée ischémie. L'athérosclérose peut toucher toutes les artères du corps mais plus particulièrement les artères coronaires, carotides, rénales et les artères périphériques. L'athérosclérose au niveau des artères du membre inférieur est appelée maladie des artères périphériques. Les principaux facteurs de risque sont : la dyslipidémie,

l'hypertension artérielle, la cigarette, le diabète, l'obésité, la sédentarité, la malnutrition, l'âge et l'historique familial (National Heart, Lung, 2018).

Le mécanisme de l'athérosclérose est un processus relativement complexe (voir figure 4). Tout d'abord, les taux élevés de lipoprotéines de basse densité (LDL) et de triglycérides sont responsables de la formation des lésions athérosclérotiques. Les LDL vont pénétrer l'endothélium et se déposer dans l'espace subendothélial en se liant aux protéoglycanes par le biais de l'apolipoprotéine B-100 (Apo B-100). Les LDL seront ensuite oxydés et vont stimuler la production de la protéine chimiotactique des monocytes-1 (MCP-1) et de facteurs de stimulation des colonies de macrophages (M-CSFs) par les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses favorisant le recrutement des monocytes circulants. Les LDL oxydés vont aussi stimuler l'augmentation de l'expression de protéines de surface des cellules endothéliales telles que la P-sélectine, la molécule d'adhésion cellulaire vasculaire-1 (VCAM-1) et la molécule d'adhésion intercellulaire-1 (ICAM-1). Ces protéines ont pour fonction de favoriser l'adhésion à l'endothélium et l'infiltration de monocytes et lymphocytes circulants. Les monocytes se retrouvent ensuite dans l'espace subendothélial et se différencient en macrophages. Les macrophages expriment alors des récepteurs éboueur (*scavenger*). Les LDL oxydés sont reconnus par les récepteurs éboueur et pénètrent dans les macrophages par endocytose. Les macrophages se gorgent de lipides et il y a rétention de ces lipides formant ainsi les cellules spumeuses. Les cellules spumeuses vont ainsi sécréter des cytokines dont l'interleukine-1 (IL-1) et le TNF- α et des facteurs de croissance dont le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) et le facteur de croissance du fibroblaste de base (bFGF). Ces facteurs auront pour effet d'amplifier la réponse inflammatoire et de favoriser la migration des cellules musculaires lisses (PDGF) dans la tunique interne du vaisseau et leur prolifération (bFGF). La prolifération des cellules musculaires lisses va ainsi contribuer à l'épaississement de la plaque athérosclérotique. Les cellules musculaires lisses vont ensuite sécréter de la matrice extracellulaire contenant du collagène et ainsi former la chape fibreuse au site de la lésion. Quant aux cellules spumeuses, elles se gorgent de plus en plus de lipides, deviennent instables et apoptotiques. Il se forme alors une un cœur nécrotique qui est une région acellulaire au centre de la lésion (Berliner et al., 1995; Singh et al., 2002; Wu et al., 2017; Zeadin et al., 2013). La plaque devient instable en présence d'une chape fibreuse mince avec inflammation et d'un core nécrotique riche en lipides (Fishbein, 2010). La plaque peut rompre

selon plusieurs mécanismes ; les cellules inflammatoires sont connues pour éroder la chape fibreuse via les métalloprotéinases matricielles (MMPs), notamment les MMP2 et 9. La présence de cytokines inflammatoires dont l'interféron-gamma (IFN- γ) produite par les cellules T en combinaison aux molécules inflammatoires telles que l'interleukine-1 beta (IL-1 β) et le TNF- α favorisent aussi la rupture de la plaque en inhibant la synthèse de collagène par les SMC. Par la suite, cette plaque ayant subi de l'érosion peut subir de l'agrégation plaquettaire pouvant évoluer vers la formation d'un thrombus. Ce thrombus peut obstruer la lumière artérielle et causer un événement cardiovasculaire (Singh et al., 2002).

Le diabète est associé avec un développement accéléré d'athérosclérose et à une augmentation de l'incidence des maladies cardiovasculaires. Les mécanismes par lesquels le diabète favorise le développement de l'athérosclérose demeurent à ce jour peu compris. Toutefois, des études *in vivo* chez des souris *ApoE*^{-/-} hyperglycémiques ont montré qu'elles développaient plus rapidement des lésions athérosclérotiques en comparaison aux souris *ApoE*^{-/-} normoglycémiques contrôles (Khan et al., 2009). Une autre étude cette fois effectuée chez des souris *LDLR*^{-/-} hyperglycémiques, un modèle murin d'athérosclérose diabétique, montre que celles-ci développent des lésions athérosclérotiques plus tôt et une augmentation de l'accumulation de macrophages artériels en comparaison aux souris contrôles normoglycémiques (Renard et al., 2004). Ces études suggèrent alors que l'hyperglycémie serait un facteur important dans le développement de l'athérosclérose. Différents mécanismes par lesquels l'hyperglycémie favoriseraient l'athérosclérose sont décrits. En effet, le stress oxydatif est impliqué dans le développement de l'athérosclérose par la génération de LDL oxydés et d'une réponse inflammatoire. De plus, le stress du réticulum endoplasmique, la résistance à l'insuline, la dyslipidémie et les modifications de la *vasa vasorum* des grosses artères seraient d'autres facteurs contribuant à l'athérogenèse en condition diabétique (Zeadin et al., 2013).

Les traitements de l'athérosclérose reposent premièrement sur le changement des habitudes de vie incluant une bonne alimentation, le maintien d'un poids santé, la réduction du stress, l'activité physique et l'arrêt complet de la consommation de cigarette. Certains patients doivent prendre des statines pour diminuer leurs niveaux sanguins de cholestérol si les changements des habitudes de vie ne suffisent pas. Dans les cas sévères, des procédures chirurgicales sont mises à la disposition

du patient. L'angioplastie est une procédure qui vise à ouvrir la lumière artérielle et à y apposer d'une endoprothèse pour conserver l'ouverture. Il existe aussi le pontage, une procédure consistant à greffer une veine ou artère pour contourner l'artère obstruée et assurer une circulation sanguine adéquate. Finalement, l'athérectomie est une procédure qui consiste à retirer la plaque athérosclérotique (National Heart, Lung, 2018).

1.4.3 La maladie des artères périphériques

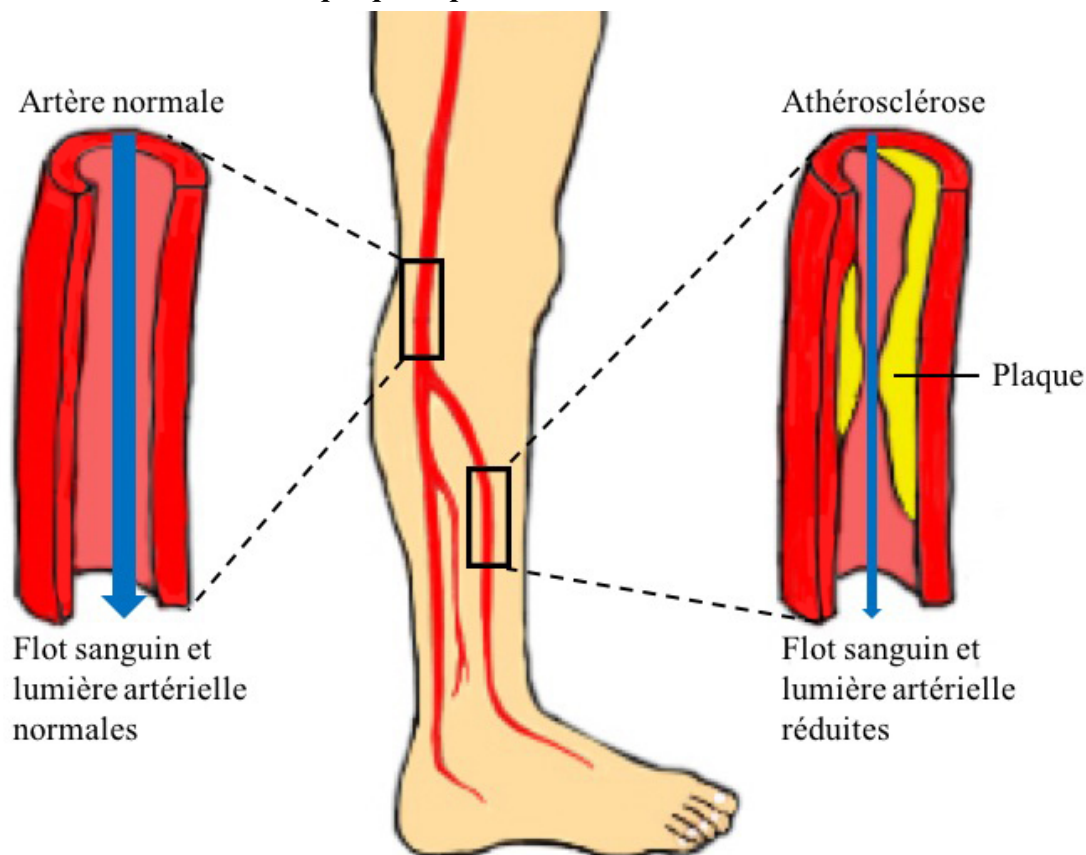


Figure 5 : Représentation schématique d'une artère obstruée par l'athérosclérose

L'artère normale (à gauche) permet une vascularisation normale en comparaison à l'artère obstruée par les plaques athérosclérotiques (à droite) en raison de la réduction de la lumière artérielle. La réduction du flot sanguin au niveau du membre inférieur est une conséquence directe de l'athérosclérose et qui est responsable des nombreuses amputations chez les patients diabétiques.

La maladie des artères périphériques (MAP) est une complication macrovasculaire du diabète qui affecte principalement les artères du membre inférieur et qui touche environ 800 000 canadiens (Lovell et al., 2015). L'incidence de la MAP est d'environ 4,3% chez les gens âgés de plus de 40 ans et augmente à 14,5% chez les personnes âgées de plus de 70 ans (Selvin et Erlinger, 2004). Environ 70% des cas de MAP peuvent être expliqués par des facteurs de risque bien établis tels

que l'âge avancé, l'hypertension, la dyslipidémie, le tabagisme et le diabète (Meijer et al., 2000). La MAP est causée par l'athérosclérose au niveau des artères qui irriguent le membre inférieur résultant en une réduction de la lumière artérielle ou un blocage complet limitant ainsi l'apport sanguin aux organes ou tissus, condition appelée ischémie (Criqui, 2001).

La présentation clinique de la MAP est la claudication intermittente et l'ischémie critique du membre inférieur. La claudication intermittente se présente par des douleurs aux muscles du membre inférieur lors d'activités physiques, lesquelles sont rapidement soulagées par le repos. L'ischémie critique du membre inférieur représentant un stade plus avancé de la pathologie, se présente par des symptômes plus sévères dont des douleurs au repos, des engourdissements, des faiblesses, des jambes et pieds froids, des ongles fragiles, secs et épaissis, une perte de poils sur les jambes et pieds et une ulcération ischémique ou la gangrène du pied. Les patients atteints d'ischémie critique sont à risque élevé de subir des amputations et événements cardiovasculaires dont l'infarctus du myocarde et l'AVC (Lovell et al., 2015; Subherwal et al., 2015). La MAP peut se présenter sous une forme asymptomatique ou symptomatique. La MAP asymptomatique serait présente chez 3 à 10% de la population et augmenterait à 15-20% chez les patients âgés de 70 ans et plus. La MAP symptomatique inclue les stades de claudication intermittente et d'ischémie critique du membre inférieur. La claudication intermittente est présente chez approximativement 3% des patients jusqu'à l'âge de 40 ans et double en prévalence pour atteindre 6% à l'âge de 60 ans. Le stade plus avancé de la MAP, l'ischémie critique du membre inférieur, requiert un traitement plus agressif en raison du haut taux de mortalité et morbidité rattaché à son diagnostic. En absence de revascularisation de l'artère touchée au niveau du membre inférieur, jusqu'à 40% des patients auront une amputation du membre inférieur et le taux de mortalité annuel excèderait 20% (Dua et Lee, 2016).

Le stade de la MAP peut être déterminé en clinique par la mesure de l'indice de pression systolique cheville-bras (IPSCB) aussi nommé l'indice tibio-brachial (ABI) comme le montre le tableau 1. Les classifications utilisées en clinique sont celle de Fontaine et de Rutherford-Becker. Un IPSCB au repos sous 0,9 est anormal et représente une MAP (Dua et Lee, 2016).

Tableau 1 : Classification de la MAP selon Fontaine et Rutherford-Becker

Classification de la MAP : Fontaine et Rutherford-Becker				
Fontaine	Rutherford-Becker		Définition	IPSCB/Pression orteils (PO)
	Grade	Catégorie		
Stade I	0	0	Asymptomatique	>0,95
Stade IIa	I	1	Claudication légère	>0,80
Stade IIb	I	2/3	Claudication modérée-sévère	>0,40
Stade III	II	4	Douleur ischémique au repos	<0,40
Stade IV	III	5/6	Perte de tissu (mineur [5]/majeur [6])	PO<30 mmHg

Il existe plusieurs traitements disponibles pour traiter la MAP. Chez les patients asymptomatiques, des modifications des habitudes de vies sont recommandées incluant de cesser de fumer, de perdre du poids et de contrôler la glycémie (Dua et Lee, 2016). Chez les patients atteints de claudication intermittente, les traitements devraient être orientés pour soulager les symptômes, pour améliorer les performances lors de l'exercice et pour améliorer les habiletés fonctionnelles. L'approche initiale de traitement devrait être composée d'exercice structuré et pour les patients dont la claudication limite l'exercice, l'approche devrait comprendre une thérapie pharmacologique incluant les statines, les inhibiteurs de la phosphodiesterase 3 et les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine. La modification des facteurs de risque et d'anticoagulants sont indiqués pour diminuer les risques d'événements cardiovasculaires. Si l'exercice et la thérapie pharmacologique ne fonctionnent pas, la revascularisation du membre inférieur doit être envisagée (Conte et al., 2015; Lovell et al., 2015). Le traitement de l'ischémie critique du membre inférieur repose sur la revascularisation en premier recours (Dua et Lee, 2016). Les traitements de revascularisation ont été abordés dans la section portant sur l'athérosclérose doit l'angioplastie avec endoprothèse, le pontage et l'athérectomie. Toutefois, l'efficacité de ces procédures chirurgicales n'aurait été démontrée qu'à court terme (Ambler et al., 2014; Chowdhury Mohammed et al., 2014).

La réduction de la lumière artérielle dans la MAP provoque une ischémie, c'est-à-dire la réduction de la perfusion sanguine des tissus ou organes du membre inférieur. Cette ischémie réduit alors l'apport en oxygène, condition appelée hypoxie. Chez les patients non diabétiques, une baisse de l'oxygénation des tissus favorisera l'induction de phénomènes pro-angiogéniques afin de contrebalancer cet apport déficient en oxygène par la formation de vaisseaux collatéraux. Toutefois, chez les patients diabétiques, ces phénomènes angiogéniques se retrouvent altérés par les hauts taux de glucose sanguins ce qui peut mener au développement de complications macrovasculaires du diabète (Martin et al., 2003). Les maladies vasculaires périphériques sont essentiellement les risques majeurs d'amputation non-traumatique des membres inférieurs chez les patients diabétiques en raison de la faible formation de vaisseaux collatéraux en réponse à l'ischémie (Deshpande et Harris-hayes, 2008). Les patients diabétiques atteints de MAP ont cinq fois plus de chances de subir une amputation des membres inférieurs que les autres patients atteints de MAP et ont un taux de mortalité trois fois plus élevé. Les patients diabétiques atteints de MAP sont à risque d'infection aggravant le risque d'amputation (Criqui et Aboyans, 2015).

1.4.4 La neuropathie diabétique

La neuropathie diabétique est une atteinte du système nerveux caractérisée par des dommages aux nerfs, en raison du taux de glucose sanguin trop élevé. La neuropathie diabétique se manifeste majoritairement au niveau des pieds et aux extrémités du corps par une diminution ou perte de sensibilité à la douleur et aux températures, par des engourdissements, des picotements et également par des sensations de brûlure (Diabète Québec, 2018). Les neuropathies diabétiques sont une cause d'hospitalisation plus fréquente que les autres complications liées au diabète et elles sont la cause la plus fréquente d'amputations non-traumatiques (Bansal et al., 2006). La neuropathie diabétique périphérique est la plus grande cause de neuropathie mondiale. On estime que la moitié des gens atteints de diabète en sont atteints (Iqbal et al., 2018). Les neuropathies périphériques sont les neuropathies diabétiques affectant les membres inférieurs de façon prédominante et supérieurs. Les neuropathies périphériques sont aussi appelées polyneuropathies symétriques distales (DSPN) ou neuropathies sensorimotrices. Les DSPN sont la forme la plus commune de neuropathies diabétiques et affectent 90% des patients (Schreiber, 2015). Cette forme de neuropathie est causée par des dommages aux nerfs des bras et des jambes. De plus, cette forme de neuropathie se développe généralement lorsqu'une hyperglycémie a été présente pendant plusieurs années comme par exemple chez des patients diabétiques de type 1 ou 2. Cependant, le

moment précis de l'apparition du diabète de type 2 est souvent inconnu et les neuropathies périphériques peuvent être présentes au moment du diagnostic (Sinnreich et al., 2005). Les neuropathies périphériques sont parfois asymptomatiques. L'étude Rochester portant sur la neuropathie diabétique (RDNS) avait une cohorte composée de 54 % de patients atteints de diabète de type 1 et 45 % de patients atteints de diabète de type 2 qui ont été diagnostiqués avec des neuropathies périphériques. Cependant, 15% des patients diabétiques de type 1 et 13% des patients diabétiques de type 2 avaient des neuropathies périphériques symptomatiques (Dyck et al., 1993). Puisque plus de 50% des neuropathies périphériques peuvent être asymptomatiques, les patients sont à risque de perdre la sensibilité aux pieds et de s'infliger des blessures accidentelles. Plus de 80% des amputations proviennent d'ulcérations des pieds suite à une blessure non traitée puisqu'elle n'a pas été remarquée par le patient (Boulton et al., 2005). De surcroît, plusieurs fibres nerveuses sont impliquées dans le développement des neuropathies périphériques dont les petites fibres nerveuses et les grandes fibres nerveuses. Celles-ci subissent des lésions, plus spécifiquement au niveau des membres inférieurs (Santiago et al., 2000). Notamment, les dommages aux petites fibres nerveuses précèdent ceux des grandes fibres nerveuses dans le développement de la neuropathie diabétique (Lacomis, 2002; Tesfaye S, Boulton AJ, Dyck PJ, 2010). Par conséquent, la plupart des patients qui ont des DSPN ont un mélange de neuropathies de petites fibres et de grandes fibres (Vinik, 2003).

1.5 La physiologie d'un vaisseau sanguin

Avant d'aborder le processus angiogénique, il est essentiel de discuter de la fonction, de la structure et de la régulation du diamètre des vaisseaux.

1.5.1 Fonction et structure d'un vaisseau sanguin

Le système circulatoire est composé du système vasculaire sanguin et du système vasculaire lymphatique. Le système circulatoire permet le mouvement des fluides afin de transporter l'oxygène (O₂) et les nutriments vers les tissus. Ce système permet aussi le transport du dioxyde de carbone (CO₂) et des déchets métaboliques en provenance des tissus. Le système circulatoire est aussi impliqué dans la thermorégulation et le transport d'hormones et cellules immunitaires.

Le système vasculaire sanguin est formé par le cœur et le système artériel, et le système veineux. Le système artériel est celui qui distribue le sang lors de la systole ventriculaire, à la

microcirculation périphérique à l'aide de capillaires et de veinules post-capillaires là où les échanges de gaz et de métabolites entre les tissus et le sang s'effectuent.

Les vaisseaux du système circulatoire en entier possèdent différentes couches comme l'indique la figure 6. Premièrement, on y retrouve un revêtement interne constitué d'une seule couche de cellules épithéliales aplaties nommées cellules endothéliales (CE). Celles-ci reposent sur une membrane basale et tissu de collagène. Toute cette couche forme la tunique interne nommée intima. Deuxièmement, on retrouve une couche intermédiaire ou tunique moyenne composée de cellules musculaires lisses concentriques nommée la média. Troisièmement, on retrouve une couche externe (tunique externe) composée de tissu de soutien contenant du collagène et du tissu élastique (tissu conjonctif) nommée adventice.

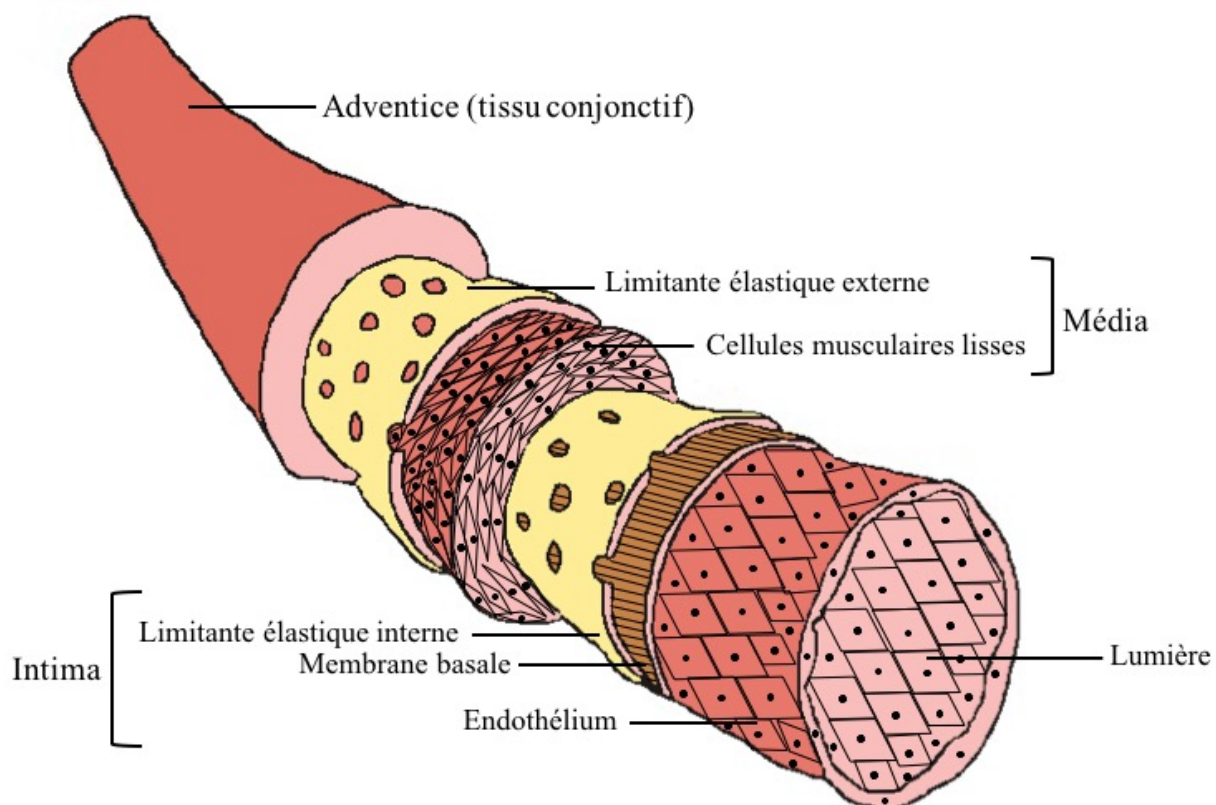


Figure 6 : Représentation schématique des couches d'une artère

Une artère est composée de trois couches. La première, l'intima, est constituée de cellules endothéliales reposant sur une membrane basale. On y retrouve également une limitante élastique interne. La seconde, la média, comprend des cellules musculaires lisses ainsi qu'une limitante élastique externe. L'adventice constitue la dernière couche et est constituée de tissu conjonctif.

La proportion des constituants des différentes couches varie selon la région anatomique. Le système artériel comprend trois types d'artères ; les artères élastiques, musculaires et les artérioles.

Les artères élastiques, caractérisées par la présence importante d'élastine dans la média, comprennent les gros vaisseaux dont l'aorte, le tronc brachio-céphalique, la carotide commune, les artères subclavières et les vaisseaux pulmonaires. Ces vaisseaux doivent pouvoir se distendre lors de la systole ventriculaire. Les artères musculaires sont les prédominantes dans l'arbre artériel. Puisqu'elles doivent distribuer le sang et maintenir la pression artérielle, leur média est riche en cellules musculaires lisses vasculaires (CMLv) disposées en couches concentriques. Dans les artères musculaires, on retrouve une limitante élastique interne située entre l'intima et la média. On retrouve également une limitante élastique externe qui sépare la média de l'adventice (voir figure 6). Les tissus constituant la paroi des artères plus volumineuses est vascularisée par de petites artères nommées *vasa vasorum* puisque l'oxygène et les nutriments ne peut s'y rendre par diffusion à partir de la lumière du vaisseau. Les *vasa vasorum* passent dans l'adventice et donnent des artérioles et capillaires dans la média (Young et al., 2015).

Tel que mentionné, le système artériel se jette dans la microcirculation qui permet les échanges de gaz, fluides, de nutriments et déchets métaboliques. Les échanges ont lieu au niveau des capillaires. Les capillaires sont des vaisseaux qui ne possèdent pas de couche musculaire ni d'adventice. Par contre, on y retrouve des cellules nommées péricytes qui entourent les cellules endothéliales et qui ont des propriétés contractiles. Le système veineux, quant à lui, est responsable du retour du sang des capillaires vers le cœur afin de permettre sa réoxygénation. Le système lymphatique est responsable de doubler le retour veineux en permettant le retour de liquide extravasculaire en excès vers le système veineux (Young et al., 2015).

1.5.2 Facteurs affectant le diamètre des vaisseaux

Plusieurs mécanismes sont responsables de la régulation du diamètre des vaisseaux. Les principaux seront décrits. L'endothélium est la couche de cellules formant la surface interne des vaisseaux. Tel qu'illustré à la figure 7, une augmentation des forces de cisaillement lors d'une augmentation de la pression permettra la relâche d'oxyde nitrique (NO) par les CE qui a une courte demi-vie. Ce NO est synthétisé à partir de la L-arginine par l'oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS) (Andrew et Mayer, 1999). Le NO est un puissant vasodilatateur qui diffuse aux CMLv. Dans les CMLv, il stimule la guanylate cyclase soluble (GCs) qui produira la guanosine monophosphate cyclique (GMPc) à partir de la guanosine triphosphate (GTP). Le GMPc ainsi formé active une protéine kinase G (PKG) qui empêche l'entrée de calcium par les canaux calciques voltage

dépendant (VDCC) et empêche aussi la relâche de calcium du réticulum sarcoplasmique (RS) médiée par le récepteur inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃R). La PKG agit aussi sur la calcium ATPase du réticulum sarcoplasmique et endoplasmique (SERCA) afin de favoriser la recapture de calcium cytosolique par le SR. Ainsi, les concentrations intracellulaires de calcium diminuent et la calmoduline est ainsi inactivée et cette dernière ne peut activer la kinase des chaînes de myosine légères (MLCK). La réduction du calcium augmente par ailleurs l'activité de la phosphatase des chaînes de myosine légère (MLCP) résultant en un bris de l'interaction actine-myosine suivi d'une relaxation des CMLv ou vasodilatation (Zhao et al., 2015).

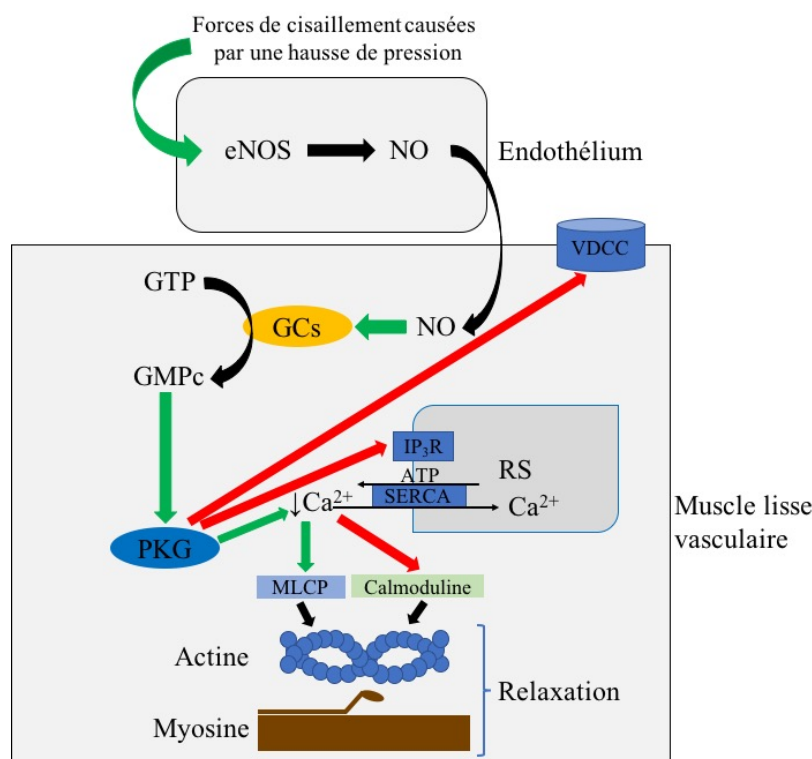


Figure 7 : Représentation schématique du mécanisme d'action de l'oxyde nitrique produit par l'endothélium sur le muscle lisse

Les forces de cisaillement causées par une hausse de pression vont activer eNOS qui formera du NO. Ce NO diffusera dans les CMLv et provoquera l'activation de la guanylate cyclase soluble qui formera du GMPc à partir du GTP. Le GMPc formé active la PKG qui empêche l'entrée de calcium par les VDCC. La PKG empêche aussi la relâche de calcium par le RS et active SERCA pour favoriser la recapture de calcium cytosolique. Les concentrations de calcium intracellulaires diminuent ce qui inactive la calmoduline et active la MLCP résultant une relaxation du muscle lisse en raison de l'absence d'interaction entre l'actine et la myosine (adapté de Zhao et al., 2015).

Les cellules endothéliales produisent aussi l'endothéline 1 (ET-1), qui est un puissant vasoconstricteur (voir figure 8). L'ET-1 produit ses effets physiologiques par deux types de

récepteurs, ET-A et ET-B. Le récepteur ET-A est fortement exprimé dans les CMLv tandis que l'ET-B est principalement exprimé dans les CE et les CMLv. La liaison de l'ET-1 sur les récepteurs ET-A et ET-B des CMLv produit une vasoconstriction. En effet, la liaison de l'ET-1 sur ces deux sous-types de récepteur dans les CMLv provoque l'activation de la protéine G_q qui active ensuite la phospholipase C bêta ($PLC\beta$). La $PLC\beta$ activée va convertir le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP_2) en inositol triphosphate (IP_3) et en diacylglycérol (DAG). L' IP_3 ainsi formé active les récepteurs à IP_3 (IP_3R) sur le réticulum endoplasmique lisse ouvrant des canaux calciques et provoquant la relâche de calcium et une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire contribuant à la contraction des CMLv. La liaison de l'ET-1 au récepteur ET-B des CE stimule la relâche de NO et limite la vasoconstriction en agissant sur les CMLv par le mécanisme décrit ci-dessus (Davenport et al., 2016).

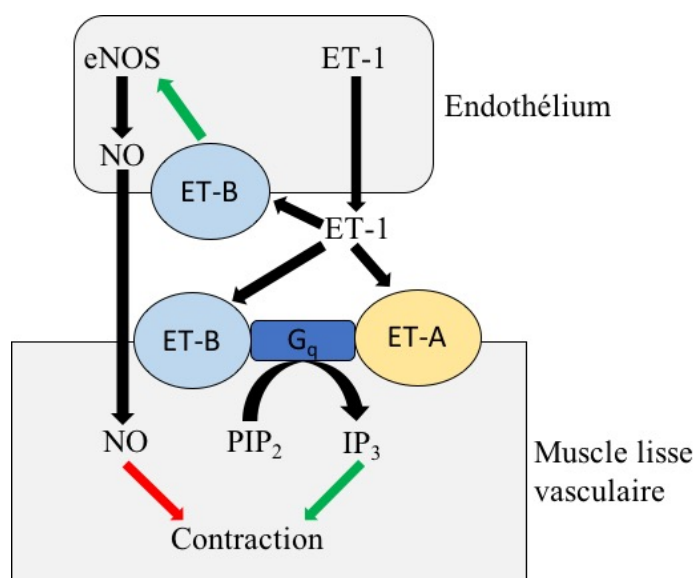


Figure 8 : Représentation schématique du mécanisme d'action de l'endothéline sur l'endothélium et le muscle lisse vasculaire

Les CE produisent l'ET-1 qui diffuse aux CMLv et se lie aux récepteurs ET-A et ET-B. Ces 2 récepteurs sont couplés à la protéine G_q . L'activation de cette protéine provoque la production d' IP_3 provoquant la contraction des CMLv par un mécanisme calcium dépendant. L'ET-1 peut se lier, de façon autocrine, sur les récepteurs ET-B présents sur les CE et provoquer la production de NO. Ce NO diffuse alors aux CMLv et provoque une inhibition de la contraction (adapté de Davenport et al., 2016).

La régulation du diamètre des vaisseaux peut également s'effectuer par d'autres mécanismes physiologiques. La régulation de la pression sanguine, afin de maintenir des valeurs normales de l'ordre de 120 mmHg/80 mmHg, peut s'effectuer par le système nerveux sympathique (SNS), par

le système rénine-angiotensine aldostérone (SRAA), par l'hormone anti-diurétique (ADH), par les peptides natriurétiques, par le système kallikréine-kinine et les prostacyclines (Jacob et al., 2011). Il existe aussi le Ces mécanismes ne seront pas élaborés dans le présent mémoire.

1.6 Le processus angiogénique

Tel que discuté précédemment, la réduction de la lumière artérielle d'un vaisseau provoque une condition appelée ischémie réduisant l'apport sanguin des tissus irrigués par ce vaisseau causant une hypoxie. En réponse à cette hypoxie, de nouveaux vaisseaux sanguins collatéraux seront formés afin d'assurer l'oxygénation et d'empêcher la mort du tissu en question. L'ischémie, en plus de créer une hypoxie, est caractérisée par une augmentation de potassium interstitiel (hyperkaliémie) et une acidose pouvant influencer l'angiogenèse (Shaw et Rudy, 1997).

1.6.1 L'angiogenèse physiologique

L'angiogenèse est un processus impliqué dans plusieurs étapes du développement humain et au cours de la vie. Lors du développement embryonnaire, le système cardiovasculaire est le premier organe fonctionnel à se développer (Breier, 2000; Chung et Ferrara, 2011). Ce processus implique la vasculogenèse et l'angiogenèse afin de permettre un apport suffisant en oxygène et en nutriments aux tissus de l'embryon en développement (Chung et Ferrara, 2011). Le phénomène d'angiogenèse est aussi impliqué dans la guérison des plaies. En effet, au cours du processus, la réparation du derme nécessite un rétablissement du flot sanguin. Ainsi, le facteur-A de croissance endothélial vasculaire (VEGF-A) sera sécrété au site de la lésion pour favoriser la formation de nouveaux vaisseaux qui émergeront dans la plaie formant alors un tissu de granulation. Plusieurs types cellulaires peuvent sécréter le VEGF-A pour favoriser la guérison dont les CE, les fibroblastes, les CMLv, les plaquettes, les neutrophiles et macrophages. Le VEGF-A va aussi stimuler le remodelage des vaisseaux nécessaire à la guérison des plaies en stimulant la dégradation de la membrane basale par différentes protéases décrites à la section 1.6.4 permettant alors la migration et prolifération des CE (Bao et al., 2009). Le processus angiogénique est aussi impliqué dans la réponse physiologique à l'exercice. En effet, des études animales ont montré qu'il y aurait une augmentation de l'expression du VEGF et du nombre de capillaires dans le muscle squelettique et cardiaque en réponse à l'augmentation de leur activité (Bloor, 2005). L'angiogenèse se produit aussi au niveau de l'endomètre lors du cycle menstruel et aussi au niveau des glandes mammaires lors de la grossesse (Groothuis, 2005).

1.6.2 L'angiogenèse pathologique

L'angiogenèse est impliquée dans plusieurs processus pathologiques. La rétinopathie diabétique est l'une des plus grandes causes mondiale de cécité (Duh et al., 2017). La rétinopathie diabétique comprend deux stades. Le premier, la rétinopathie diabétique non-proliférative, et le second la rétinopathie diabétique proliférative. Ces stades sont marqués par l'altération progressive de la microvasculature de la rétine (Eshaq et al., 2017). La perte de péricytes et la formation de microanévrismes caractérisent les changements précoces dans la rétinopathie diabétique (Hammes, 2005). Au cours des stades de la rétinopathie diabétique, il y a perte de capillaires et formation de zones ischémiques (Eshaq et al., 2017). En réponse à cette hypoxie, lors du stade prolifératif, il y a une formation anormale de vaisseaux sanguins notamment en raison d'une augmentation de l'expression du VEGF (Tarr et al., 2013). Les nouveaux vaisseaux formés dans la rétine sont fragiles et laissent passer des fluides et protéines menant à un œdème maculaire, à l'accumulation de sang (microhémorragies) et à ultimement à la perte de vision (Eshaq et al., 2017).

Un autre processus pathologique d'angiogenèse est la formation de tumeur. Lorsqu'une tumeur devient suffisamment volumineuse, sa demande en oxygène et en nutriments va dépasser l'apport local ce qui crée un environnement hypoxique. Cet environnement hypoxique va promouvoir l'angiogenèse par le facteur inductible par l'hypoxie (HIF) (Dayan et al., 2008). Les HIFs ont la capacité d'induire la transcription de VEGF-A et d'initier l'angiogenèse. La sous-unité HIF-1 α est régulée par les niveaux d'oxygène et en concentrations normales d'oxygène, elle est dégradée par le protéasome, un processus médié par le suppresseur de tumeur *von Hippel-Lindau* (VHL). Dans certains cancers, on retrouve une mutation dans VHL ce qui empêche la dégradation d'HIF-1 α et stimule donc l'angiogenèse tumorale (Pugh et Ratcliffe, 2003). De plus, les tumeurs et vaisseaux tumoraux issues d'une surexpression de VEGF-A ont une morphologie anormale c'est-à-dire tortueuse, fragiles et manquent de péricytes. De plus, ils sont prédisposés à des saignements et à la formation d'exsudat (Nagy et al., 2007).

Le VEGF-A peut aussi agir de façon autocrine afin de promouvoir et stimuler l'invasion et la survie des cellules tumorales (Lichtenberger et al., 2010). On observe aussi une augmentation de la prolifération des vaisseaux sanguins en cas de psoriasis, d'obésité, d'asthme et d'athérosclérose. De plus, il existe des cas d'angiogenèse insuffisante et de régression anormale de vaisseaux

conduisant à la neurodégénérescence, à l'ischémie cérébrale et cardiaque, à l'hypertension, à l'ostéoporose, à l'endométriose et à la prééclampsie (Carmeliet, 2003, 2005).

1.6.3 La vasculogénèse

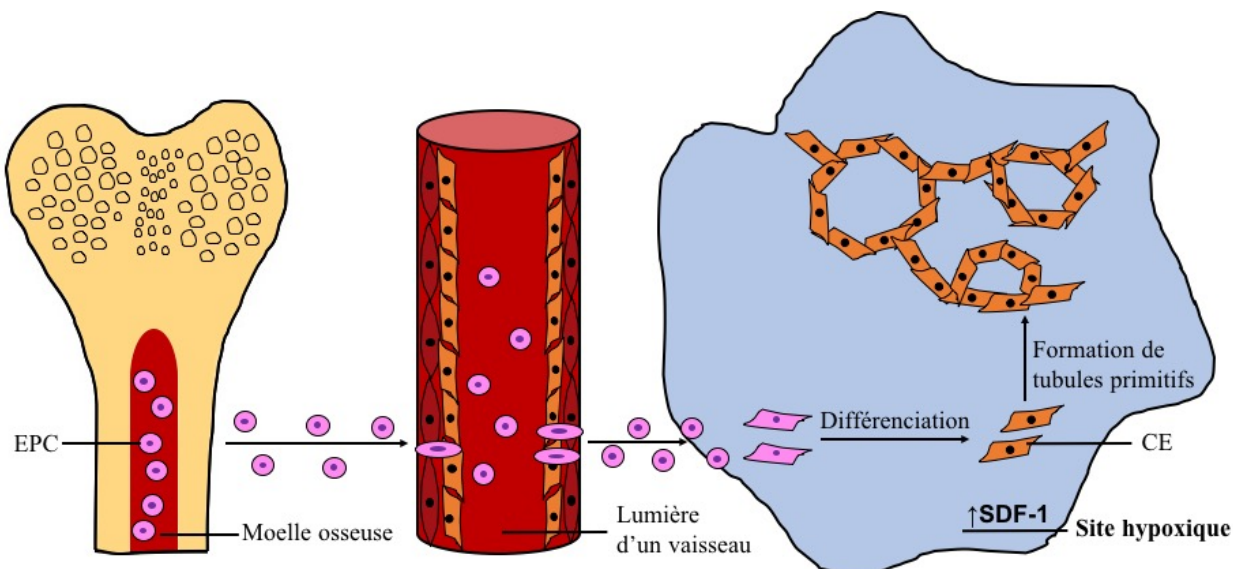


Figure 9 : Représentation schématique de la vasculogénèse

L'hypoxie à un site provoque une augmentation de l'expression de SDF-1, une chimiokine qui attire les cellules progénitrices endothéliales (EPCs) à entrer en circulation et à se rendre au site hypoxique. Une fois rendues au site hypoxique, les EPCs vont se différencier en cellules endothéliales (CEs) et vont proliférer et s'assembler en tubules primitifs, immatures (adapté de Conway et al., 2001).

Comme mentionné précédemment, la vasculogénèse est un processus physiologique qui a lieu au cours du développement embryonnaire et foetal. En effet, l'embryon est initialement nourri par diffusion puis un réseau vasculaire formé de plexus capillaires et de vaisseaux sanguins se développe au sein de l'embryon par le processus de vasculogénèse (Bussolino et al., 1997). Ce développement *de novo* de vaisseaux sanguins se fait par le recrutement de cellules progénitrices différenciées nommées angioblastes (Kassmeyer et al., 2009). La vasculogénèse peut aussi se produire chez les adultes, on parle alors de vasculogénèse post-natale. Ce processus est caractérisé par le recrutement de cellules progénitrices endothéliales (EPCs) en réponse à des cytokines ou à une ischémie. Les EPCs sont originaires de la moelle osseuse et vont se rendre au site ischémique par la circulation sanguine puis finalement se différencier en CEs (Murasawa et Asahara, 2005). Le recrutement des EPCs aux sites ischémiques se fait par l'augmentation de l'expression du facteur-1 dérivé des cellules stromales (SDF-1), une chimiokine dont l'expression est augmentée

par HIF-1 α (Ceradini et al., 2004; Ceradini et Gurtner, 2005). D'autres facteurs favorisent le recrutement des EPCs, notamment le VEGF qui est relâché suite à un traumatisme de nature mécanique des tissus favoriserait le recrutement des EPCs au site vasculaire blessé pour favoriser la guérison des vaisseaux (Gill et al., 2001). L'hypoxie stimulerait aussi l'augmentation de l'expression d'eNOS, augmentant du coup les niveaux de NO par un mécanisme dépendant d'HIF-1. L'augmentation des niveaux de NO favorise le transfert des EPCs de la moelle osseuse à la circulation sanguine (Bento et Pereira, 2011). Par ailleurs, les EPCs stimuleraient la revascularisation selon différents mécanismes. Une fois arrivés au site hypoxique, les EPCs différenciées prolifèrent et participent à l'angiogenèse. De plus, les EPCs relâcheraient des facteurs dont le VEGF, le SDF-1, le PDGF et des microparticules qui vont favoriser l'angiogenèse, la prolifération et la migration des CE. Les EPCs pourraient aussi, une fois différenciées en CEs, s'intégrer directement dans l'endothélium endommagé contribuant alors à sa réparation. Il est important de mentionner que les mécanismes inflammatoires classiques impliquent la prolifération de CE sans avoir nécessairement recours aux EPCs. De plus, les EPCs relâcheraient des microvésicules membranaires pour transmettre de l'ARN messager (ARNm) qui s'intégreraient aux ECs afin de promouvoir la prolifération, la formation de tubules, et la réduction de l'apoptose (Liao et al., 2017). Les niveaux de SDF-1 sont élevés dans la moelle osseuse en raison des faibles niveaux en oxygène ce qui permet de maintenir les EPCs dans la moelle. Comme nous l'avons vu, l'hypoxie causée à un site va provoquer une augmentation de l'expression de SDF-1 et recruter les EPCs. Une fois tout le processus de revascularisation terminé et que les niveaux d'oxygène sont rétablis, les niveaux d'expression de SDF-1 retournent à la normale ce qui arrête le recrutement des EPCs (Ceradini et Gurtner, 2005). La vasculogenèse est donc un processus dans lequel des tubules primitifs seront formés et se joindront ensemble pour former un plexus vasculaire peu organisé. Au cours de l'angiogenèse, ce plexus deviendra mature et formera un réseau de capillaires fonctionnels (Silvestre et al., 2013).

1.6.4 L'angiogenèse

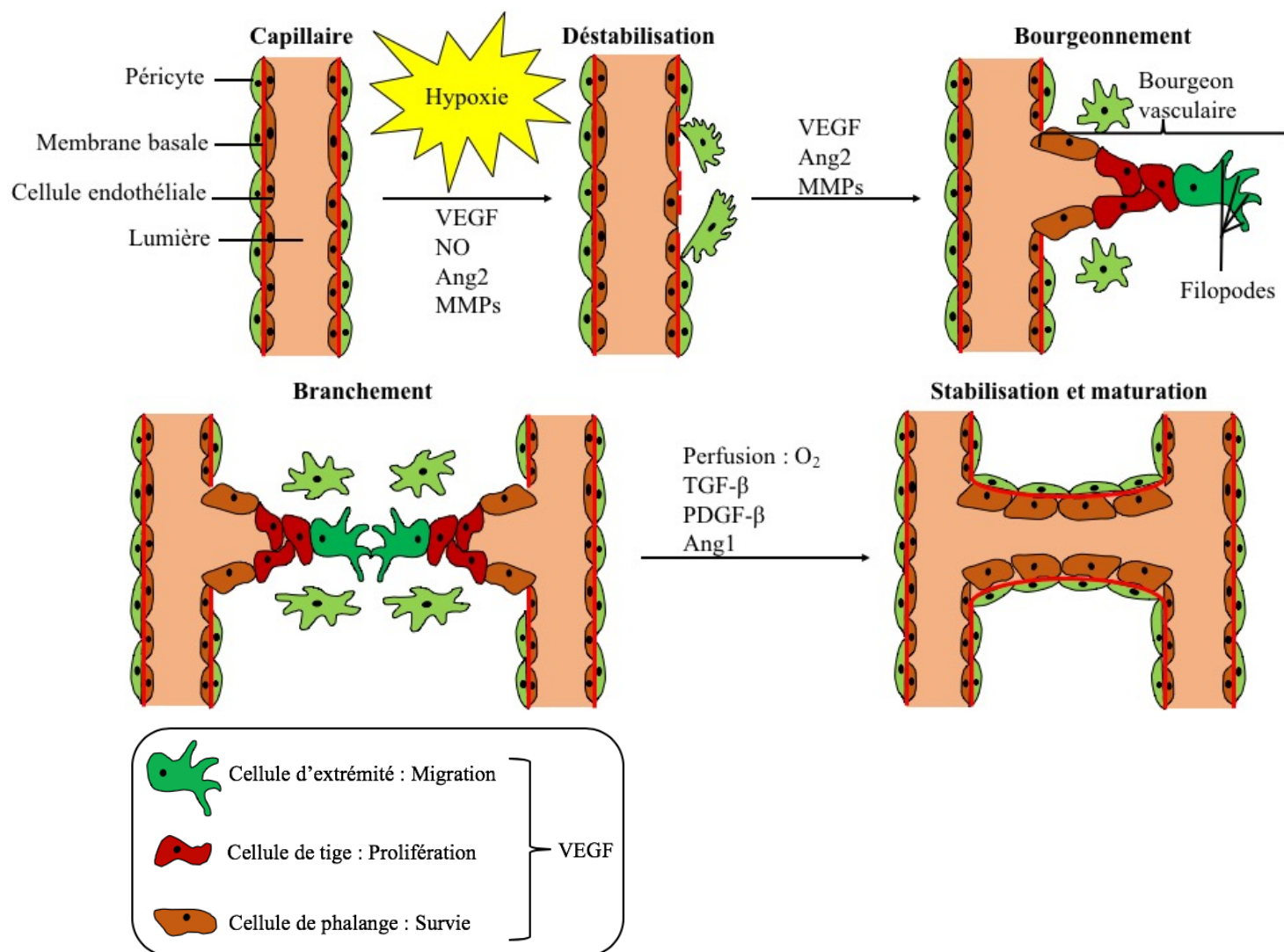


Figure 10 : Représentation schématique de l'angiogenèse au niveau d'un capillaire

L'hypoxie stimule l'augmentation de l'expression de VEGF et NO ce qui favorise la vasodilatation et l'augmentation de la perméabilité vasculaire. Les métalloprotéinases de la matrice (MMPs) vont provoquer la dégradation de la membrane basale et l'angiopoïétine 2 (Ang2), le détachement des péricytes. Les cellules endothéliales (CEs) seront ensuite libres de migrer et formeront un bourgeon vasculaire. À même ce bourgeon vasculaire, différents phénotypes de CEs seront présentes. On retrouve la cellule d'extrémité qui est migratoire, les cellules de tige qui prolifèrent et les cellules de phalange qui expriment des signaux de survie. Le bourgeon vasculaire va éventuellement rencontrer un autre bourgeon et une anastomose se formera. S'en suit la stabilisation et la maturation du vaisseau. La perfusion normale du vaisseau provoquera une réduction de l'expression du VEGF. La maturation s'effectue sous l'action de différents facteurs dont le facteur-B de croissance dérivé des plaquettes (PDGF-B) qui provoquera la prolifération et la migration des cellules murales. Le TGF-β1 va stimuler la production de MEC et la différenciation de cellules mésenchymateuses en cellules murales. L'Ang1 va assurer l'étanchéité

du vaisseau en se liant au récepteur Tie2. Les CE exprimeront ensuite des signaux de survie (adapté de Clapp et al., 2009 ; Potente et al., 2011 ; Warren et Iruela-Arispe, 2010).

L'angiogenèse est un processus physiologique complexe à partir duquel des vaisseaux sanguins seront formés à partir de vaisseaux pré-existants. Ces vaisseaux se forment à partir du réseau primitif formé lors de la vasculogenèse (Silvestre et al., 2013). L'angiogenèse est un processus fortement stimulé par l'hypoxie. L'hypoxie va augmenter l'expression du VEGF, d'eNOS et de l'angiopoïétine 1 (Ang1) et de l'angiopoïétine 2 (Ang2) (Pugh et Ratcliffe, 2003). Il y aura ensuite une vasodilatation des vaisseaux en réponse au NO et une augmentation de la perméabilité vasculaire causée par le VEGF (Ashrafpour et al., 2003). La vasodilatation se fait aussi par la perte de l'intégrité des jonctions serrées laquelle est causée par la phosphorylation des protéines de jonction (Takenaga et al., 2009).

Afin de former un bourgeon vasculaire, les CE doivent être libérée, un processus nécessitant la dégradation de la membrane basale et le détachement des cellules murales (CMLv et péricytes). Pour cela, les métalloprotéinases de la matrice (MMPs), libérées par les CE du bourgeon, vont dégrader la membrane basale (Blasi et Carmeliet, 2002). Cette dégradation entraînera la libération de facteurs pro-angiogéniques (Arroyo et Iruela-Arispe, 2010). Le détachement des cellules murales serait stimulé par l'Ang2 produit par les CE (Augustin et al., 2009; Huang et al., 2010; Jain, 2003). Les CE seront ensuite libres pour migrer. Le rôle d'Ang2 dépend de la présence de VEGF : en présence de VEGF, l'Ang2 favorise le bourgeonnement tandis qu'en absence de VEGF, l'Ang2 provoque la régression vasculaire par leur déstabilisation (Jain, 2003). Seulement un sous-ensemble de CE pourra former un bourgeon et répondra aux signaux pro-angiogéniques (Gridley, 2007). Il y a trois types de cellules avec des phénotypes différents impliquées dans la formation d'un bourgeon vasculaire. Chaque bourgeon vasculaire est composé d'une cellule d'extrémité devant, de cellules de tige au milieu, et de cellules de phalange à la base du bourgeon vasculaire (Arroyo et Iruela-Arispe, 2010). La cellule d'extrémité est une cellule non-proliférative possédant des filopodes et exprimant beaucoup de récepteurs au VEGF de type 2 (VEGFR2). Ces cellules ont la particularité de détecter et de répondre aux différents gradients de VEGF et elles sont par ailleurs migratoires (Warren et Iruela-Arispe, 2010). La cellule d'extrémité a aussi la particularité de créer des connexions entre différents bourgeons pour former des réseaux (Blanco et Gerhardt, 2013). Les cellules de tige vont proliférer sous l'action du VEGF, permettant ainsi l'élongation du

vaisseau. Ces cellules forment des jonctions adhérentes et serrées afin d'assurer la stabilité du vaisseau en formation et forment la lumière du vaisseau (Blanco et Gerhardt, 2013; Warren et Iruela-Arispe, 2010). Les cellules de phalange sont quant à elles des cellules quiescentes qui expriment des signaux de survie sous l'action du VEGF en raison des niveaux élevés de cadhérine endothéliale vasculaire (VE-cadhérine) et de récepteurs au VEGF de type 1 (VEGFR1) (Warren et Iruela-Arispe, 2010). Éventuellement les cellules d'extrémité de deux bourgeons vasculaires vont se rencontrer et s'anastomoser entre elles pour ainsi former de nouveaux réseaux de vaisseaux. Une fois que les niveaux d'oxygène redeviennent normaux suite à la perfusion adéquate du vaisseau, les niveaux d'expression du VEGF reviennent à un état basal (Potente et al., 2011).

Vient ensuite l'étape de la maturation du vaisseau nouvellement formée. La maturation des vaisseaux se fait principalement par le recrutement de cellules murales et en régénérant la matrice extracellulaire (MEC). Les cellules murales des capillaires et vaisseaux immatures sont les péricytes alors que celles des artères et veines sont les CMLv. Au niveau des capillaires, les péricytes sont en contact direct avec les ECs alors que dans les artères et veines, les CMLv sont séparées des ECs par une matrice (Potente et al., 2011). Le PDGF est sécrété par les CEs en réponse au VEGF et provoque le recrutement des cellules murales. Lorsque le PDGF se lie à son récepteur, le récepteur-bêta du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGFR- β) exprimé à la surface des CEs et des cellules murales, il va provoquer la prolifération et la migration de ces dernières. Par ailleurs, le facteur de croissance transformant bêta (TGF- β) est aussi impliqué dans la maturation des vaisseaux. En effet, le TGF- β 1 va stimuler la production de MEC et la différenciation de cellules mésenchymateuses en cellules murales. L'Ang1 participe aussi dans la maturation des vaisseaux. L'Ang1, produit par les cellules murales, va se lier à son récepteur Tie2 et induira la stabilisation du vaisseau en formation en favorisant l'étanchéité de ce dernier en facilitant la communication entre les cellules murales et les CEs (Jain, 2003). Finalement, lors de la maturation des vaisseaux, les CEs prolifèrent moins et doivent exprimer des signaux de survie afin de maintenir l'intégrité du vaisseau. Ces signaux de survies se feront via l'action intracrine du VEGF produit par les CEs afin d'inhiber leur apoptose (Warren et Iruela-Arispe, 2010).

1.7 L'hypoxie et les HIFs

Jusqu'à présent, le mécanisme de l'angiogenèse a été décrit. Cette section décrira comment les faibles niveaux d'oxygène modulent l'augmentation de l'expression de joueurs clés impliqués dans l'initiation de l'angiogenèse.

1.7.1 La régulation de HIF-1 α

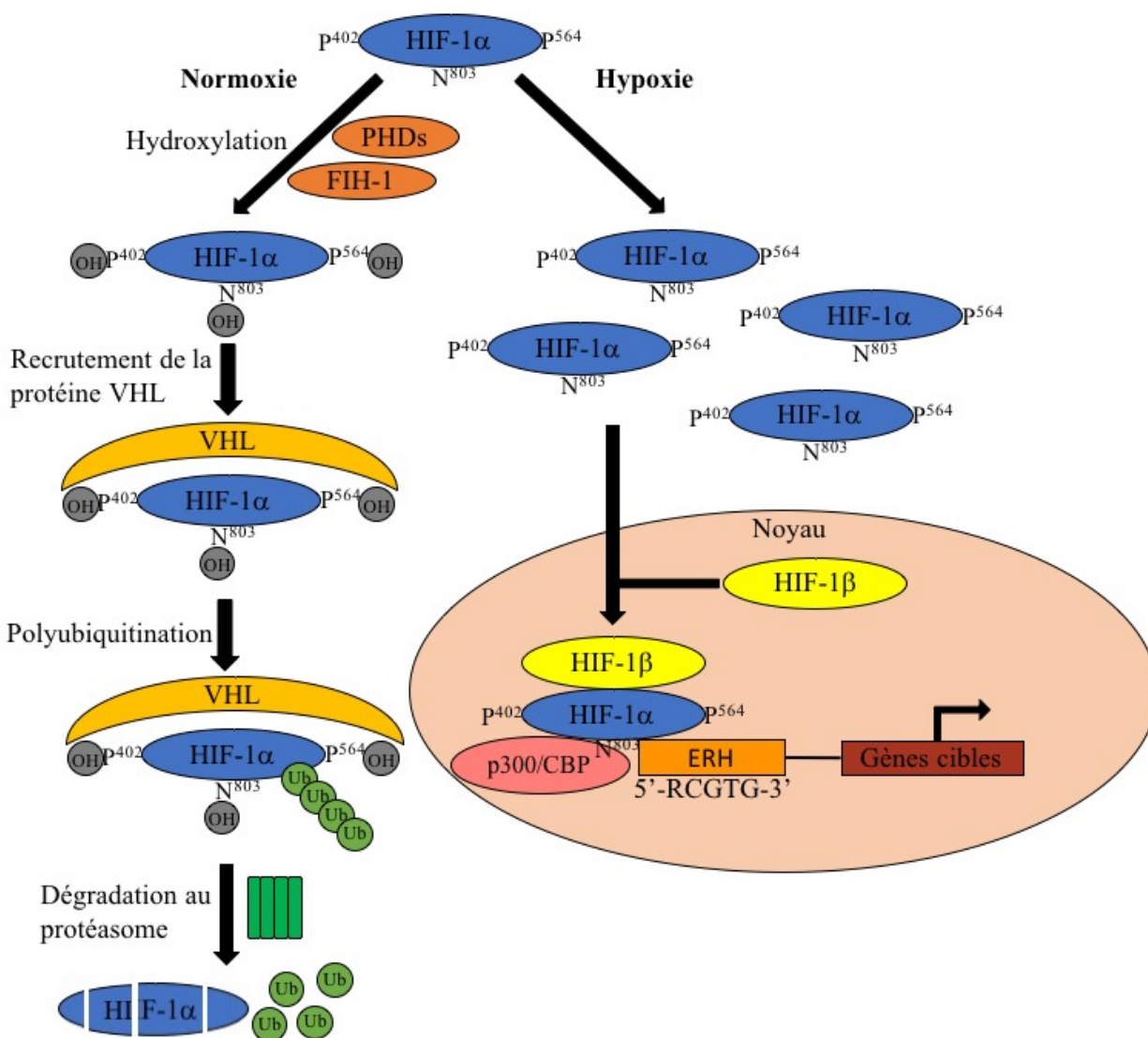


Figure 11 : Régulation d'HIF-1 α en normoxie et en hypoxie

Lorsque les niveaux d'oxygène sont suffisants, HIF-1 α est hydroxylé sur les résidus proline 402 et 564 par les prolyl hydroxylases (PHDs) afin qu'elle soit reconnue la protéine von Hippel-Lindau (VHL) puis ubiquitinée avant d'être dégradée. Le facteur inhibiteur de HIF-1 (FIH-1) permet en présence de concentrations normales d'oxygène l'hydroxylation du résidu asparagine 803 de HIF-1 α empêchant l'interaction d'HIF-1 α avec le co-activateur p300/CBP inhibant davantage l'activité transcriptionnelle de HIF-1. Lorsque les niveaux d'oxygène deviennent limités, les PHDs et FIH-

Il ont une activité réduite en raison du manque d'oxygène et ne sont plus en mesure d'hydroxyler HIF-1 α . Cette absence d'hydroxylation mène à l'accumulation de HIF-1 α qui va dimériser au noyau avec HIF-1 β formant l'hétérodimère HIF-1 fonctionnel. HIF-1 α va interagir avec le co-activateur p300/CBP et HIF-1 va se lier sur une séquence (5'-RCGTG-3') située dans l'élément de réponse à l'hypoxie (ERH) du promoteur de gènes impliqués dans l'angiogenèse et induire leur transcription (adapté de Bento et Pereira, 2011).

Un apport en oxygène adéquat est nécessaire au maintien la bonne homéostasie cellulaire. Lorsque la disponibilité en oxygène est réduite, la cellule met en place différents mécanismes pour rétablir l'oxygénation. Des voies de signalisation seront activées, lesquelles sont régulées par le facteur-1 inductible par l'hypoxie (HIF-1). La cellule activera HIF-1 par un mécanisme dépendant des taux d'oxygène. HIF-1 est sous sa forme active lorsqu'il est un hétérodimère composé de la sous-unité HIF-1 β , laquelle est constitutivement exprimée et ce indépendamment des taux d'oxygène et d'une sous-unité HIF-1 α dont l'expression varie selon les concentrations d'oxygène présentes dans l'environnement cellulaire (Bento et Pereira, 2011). On distingue donc deux voies principales pour HIF-1 α , soit en normoxie et en hypoxie, lesquelles sont représentées à la figure 11.

Lorsque les taux d'oxygène sont suffisants dans l'environnement cellulaire, HIF-1 n'est pas reconstituée et ne possède donc aucune activité transcriptionnelle. Cet état inactif s'explique par le fait qu'HIF-1 α est très peu détectable, car elle est rapidement synthétisée puis dégradée par la voie ubiquitine-protéasome. La demi-vie d'HIF-1 α est de moins de 5 minutes. En effet, en conditions normales d'oxygène, HIF-1 α est hydroxylée sur les résidus proline 402 et 564 par les prolyl hydroxylases (PHDs), des protéines nécessitant l'oxygène et le 2-oxoglutarate comme co-substrats puis le fer (Fe²⁺) comme co-facteur. Lorsqu' HIF-1 α est hydroxylée, elle est reconnue par la protéine von Hippel-Lindau (VHL). Le complexe E3 ubiquitine ligase dont fait partie VHL est responsable de la polyubiquitination d'HIF-1 α et de sa dégradation subséquente par le protéasome. HIF-1 α est aussi hydroxylé sur le résidu asparagine 803 par une hydroxylase spécifique à l'asparagine nommée facteur inhibiteur de HIF-1 (FIH-1). FIH-1, en hydroxylant l'asparagine 803, va empêcher l'interaction d'HIF-1 α avec le co-activateur p300/CBP (Protéine de liaison à CREB) inhibant de façon supplémentaire l'activité transcriptionnelle d'HIF-1 (Bento et Pereira, 2011).

En hypoxie, la réduction des taux d'oxygène diminue considérablement l'activité des PHDs et ceux-ci ne sont plus en mesure d'hydroxyler les résidus proline d'HIF-1 α qui n'est alors plus dégradée. Ainsi HIF-1 α s'accumule dans la cellule et va migrer au noyau et dimériser avec HIF-1 β . Une fois l'hétérodimère formé, il va se lier à une séquence (5'-RCGTG-3') située dans l'élément de réponse à l'hypoxie (ERH) du promoteur de gènes impliqués dans l'adaptation et la survie, l'angiogenèse, le métabolisme anaérobie du glucose, l'érythropoïèse, la croissance cellulaire, la différenciation, la survie et l'apoptose afin de favoriser leur transcription. L'activité transcriptionnelle d'HIF-1 α est renforcée par la liaison de l'asparagine 803 au co-activateur p300/CBP. Puisque l'hydroxylation de l'asparagine 803 est absente en hypoxie, p300/CBP peut maintenant interagir avec le résidu asparagine 803 d'HIF-1 α ce qui renforce davantage l'activité transcriptionnelle d'HIF-1.

Parmi les gènes induits sous l'influence d'HIF-1, on compte le gène du VEGF, tel que discuté dans le mécanisme d'angiogenèse. HIF-1 augmente aussi l'expression de eNOS, de SDF-1 et de son récepteur nommé récepteur de chimiokine C-X-C de type 4 (CXCR4) (Bento et Pereira, 2011).

1.7.2 Dérégulation de HIF-1 dans le diabète

Puisque HIF-1 est un important régulateur de la réponse cellulaire à l'hypoxie, la dérégulation de HIF-1 chez les patients diabétiques pourrait expliquer la perte de l'induction de phénomènes angiogéniques en présence de faibles concentrations d'oxygène (Bento et Pereira, 2011).

Une étude a montré que des patients diabétiques de type 2 montraient des niveaux d'expression réduits en ARNm de HIF-1 β dans les îlots pancréatiques, en comparaison à des patients non-diabétiques (Gunton et al., 2005). Un polymorphisme génétique de HIF-1 α a été associé avec le diabète de type 2 (Nagy et al., 2009; Yamada et al., 2005) et avec l'absence de vaisseaux collatéraux chez des patients avec maladie cardiaque ischémique (Resar et al., 2005). Une étude réalisée dans des fibroblastes humains et des cellules endothéliales humaines a montré que leur exposition à des concentrations élevées de glucose diminuait la stabilisation et la fonction de HIF-1 α . Cette dérégulation de HIF-1 α serait indépendante des PHDs, car leur inhibition ne permettrait pas de prévenir la réduction de l'activité de HIF-1 α . Ces études suggèrent un lien entre le diabète et l'altération de la voie de signalisation de HIF-1 ainsi que la dysfonction endothéliale.

De plus, des analyses de biopsies d'ulcères plantaires diabétiques ont montré une diminution des niveaux de HIF-1 α en comparaison à des biopsies d'ulcère veineux. À noter que ces deux types d'ulcères sont en condition hypoxiques, cependant les ulcères veineux ne sont pas exposés à l'hyperglycémie contrairement aux ulcères plantaires diabétiques (Catrina et al., 2004). Par ailleurs, la production de HIF-1 α était altérée lors de la guérison de grandes plaies cutanées chez de jeunes souris *db/db* (Liu et al., 2008; Mace et al., 2007), un modèle murin diabétique obèse ayant une mutation dans le récepteur de la leptine (Sharma et al., 2008). Dans ce modèle, l'augmentation de l'expression de HIF-1 α par thérapie génique a accéléré l'angiogenèse et la guérison des plaies (Liu et al., 2008; Mace et al., 2007). Une étude a montré l'implication de HIF-1 α dans un modèle murin diabétique d'ischémie critique du membre inférieur. Dans ce modèle, l'injection d'un vecteur adénoviral codant pour HIF-1 α a permis de rétablir la perfusion du muscle ischémique de même que sa fonction, de réduire le tissu nécrotique, d'augmenter l'activation de la eNOS, d'augmenter le niveau de cellules angiogéniques circulantes et d'augmenter la densité vasculaire dans le membre ischémique (Sarkar et al., 2009). Ces études montrent le lien entre la dérégulation de HIF-1 α l'altération du phénomène angiogénique en condition diabétique.

Il est également connu que le diabète provoque une augmentation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) modulant à la baisse l'activité de HIF-1 α . Cette réduction de l'activité de HIF-1 α en condition d'hyperglycémie peut être rétablit par un traitement antioxydant soit l' α -tocopherol (Katavetin, 2006). Une étude a montré que l'administration d'une forme tronquée d'une séquence de HIF-1 α fusionnée à un transactivateur du virus de l'herpès simplex VP16 (HIF-1 α /VP16) a permis d'augmenter la formation de vaisseaux collatéraux et le flot sanguin dans un modèle de lapin avec ischémie du membre inférieur (Vincent et al., 2000). Finalement, un traitement antioxydant a permis de rétablir la vasculogenèse dans un modèle murin dont le diabète a été induit par la streptozotocine (STZ) en raison de l'augmentation de l'expression de SDF-1 et de VEGF causée par l'augmentation de l'activité de HIF-1 α (Ceradini et al., 2008).

1.7.3 Mécanisme de dérégulation de HIF-1 α en hypoxie par le diabète

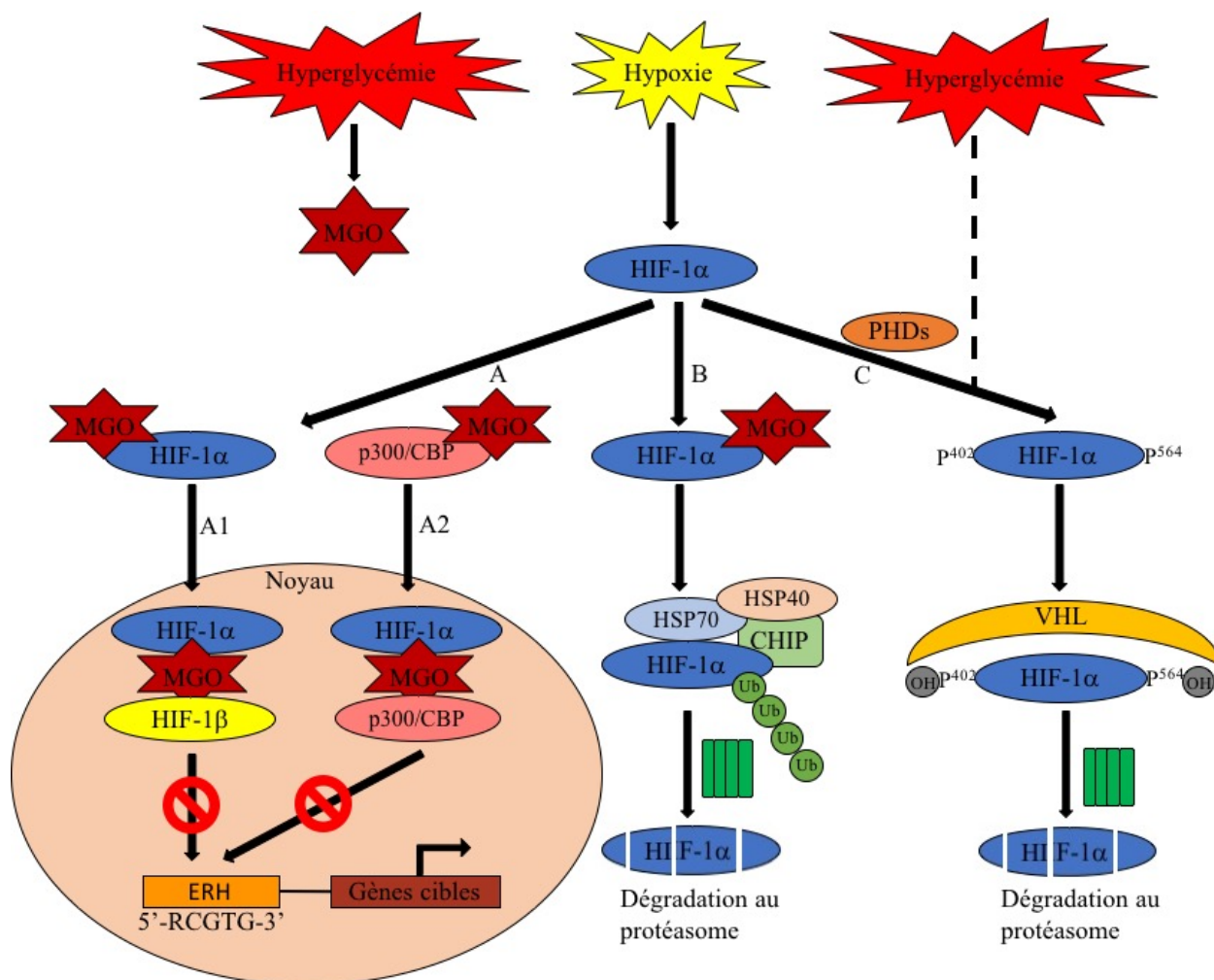


Figure 12 : Représentation schématique de la dérégulation d'HIF-1 α en hypoxie par le diabète

L'hyperglycémie provoque l'augmentation des niveaux de méthylglyoxal (MGO). Ce MGO peut dans un premier modifier HIF-1 α empêchant la formation de l'hétérodimère HIF-1 ce qui empêche son activité transcriptionnelle (A1). Le MGO peut modifier p300 ce qui altère son interaction avec HIF-1 α réduisant l'activité transcriptionnelle de HIF-1 (A2). Le MGO peut modifier HIF-1 α ce qui permet l'association de HIF-1 α avec les chaperones moléculaires HSP40 et HSP70 et de CHIP induisant la polyubiquitination de HIF-1 α et sa dégradation au protéasome (B). L'hyperglycémie induirait l'hydroxylation de HIF-1 α sur ses résidus proline 402 et 564 permettant le recrutement de VHL et la dégradation au protéasome de HIF-1 α (C) (adapté de Bento et Pereira, 2011).

La perte de la réponse cellulaire à l'hypoxie et l'altération de HIF-1 α en condition d'hyperglycémie est encore peu connue. Toutefois, quelques mécanismes ont été proposés dans la littérature. Premièrement, il est connu que l'hyperglycémie provoque une augmentation de la production de méthylglyoxal (MGO). Une étude réalisée avec des fibroblastes dermiques de souris

en hypoxie a montré que le MGO modifiait HIF-1 α sur les résidus arginine 17 et 23, empêchant alors l'interaction de HIF-1 α avec HIF-1 β . En empêchant la formation d'un hétérodimère actif, HIF-1 n'a pas d'activité transcriptionnelle (Ceradini et al., 2008). Une autre étude a montré que l'interaction entre p300 et HIF-1 α était réduite en hyperglycémie en raison de la modification de p300 par le MGO, laquelle pouvait être prévenue par une mutation de l'arginine 354 de p300. Dans cette même étude, ils ont montré que la modification de HIF-1 α par le MGO n'empêchait pas la liaison de HIF-1 α avec p300. Par contre, une réduction de la production de VEGF a été observée ce qui suggère que l'altération de la dimérisation entre HIF-1 α /HIF-1 β et de l'association HIF-1 α /p300 serait responsable de la dérégulation de l'activité transcriptionnelle de HIF-1 (Thangarajah et al., 2009).

Deuxièmement la modification de HIF-1 α par le MGO permettrait l'augmentation de l'association de HIF-1 α avec les chaperones moléculaires HSP40 et HSP70. Ces chaperones recruteraient ensuite le c-terminal de la protéine d'interaction HSC70 (CHIP). Le recrutement de CHIP favoriserait alors la polyubiquitination de HIF-1 α , et sa dégradation au protéasome (Bento et al., 2010).

Troisièmement, les hydroxylases de HIF seraient impliquées dans l'altération de la réponse cellulaire induite par HIF en hypoxie et en hyperglycémie. L'inhibition des hydroxylases a permis de prévenir les effets néfastes de concentrations élevées de glucose sur la stabilité et l'activité de HIF-1 α et sur l'expression de gènes cibles induits par HIF-1. Cet effet était absent dans des cellules de carcinome rénal produisant une forme inactive de VHL, suggérant une déstabilisation de HIF-1 α en hyperglycémie par un mécanisme dépendant de VHL favorisant alors sa dégradation au protéasome. De plus, la guérison de plaies de souris diabétiques *db/db* était améliorée par l'inhibition des hydroxylases de HIF (Botusan et al., 2008). Ces résultats montrent que l'hyperglycémie combinée à l'hypoxie provoque l'hydroxylation de HIF-1 α sur ses résidus proline favorisant le recrutement de VHL et la dégradation au protéasome d'HIF-1 α .

1.7.4 Stratégies thérapeutiques impliquant HIF-1 α

Considérant le rôle protecteur de HIF-1 α dans l'ischémie du membre inférieur chez des patients diabétiques, des études cliniques ont été réalisées. Une première étude de phase 1 a testé l'effet de

l'administration d'un adénovirus codant pour HIF-1 α au niveau du membre inférieur de patients atteints d'ischémie critique, un stade avancé de maladie des artères périphérique (MAP). Les résultats à un an se sont montrés encourageants et démontrent que l'administration du vecteur adénoviral codant pour HIF-1 α a permis de résorber complètement la douleur au repos chez 14 des 32 patients et a aussi permis de guérir complètement des ulcères chez 5 des 18 patients. Cette méthode thérapeutique s'est avérée efficace et a montré peu d'effets adverses outre l'œdème périphérique, la progression de la maladie et l'ischémie périphérique. En raison de l'efficacité du traitement, l'innocuité fut obtenue (Rajagopalan et al., 2007). Une étude de plus grande envergure conclut que la thérapie génique avec administration intramusculaire d'un vecteur adénoviral exprimant HIF-1 α n'est pas efficace pour des patients atteints de MAP avec claudication intermittente en comparaison à un groupe placebo (Creager et al., 2011). Les résultats n'ont montré aucune différence significative quant au temps de marche maximal, au temps de début de la claudication et à l'indice de pression systolique cheville-bras (IPSCB). Ainsi, la surexpression d'HIF-1 α ne constitue donc pas une stratégie thérapeutique efficace pour le traitement de la MAP.

1.8 Les facteurs angiogéniques

Plusieurs facteurs angiogéniques sont impliqués dans le processus d'angiogenèse. Dans cette section, les principaux facteurs seront abordés.

1.8.1 Le VEGF

Le VEGF est un facteur de croissance impliqué dans le processus angiogénique tel que décrit précédemment. La famille du VEGF comprend essentiellement 7 membres dont le VEGF-A, le VEGF-B, le VEGF-C, le VEGF-D, le VEGF-E, le VEGF-F et le PlGF. Le VEGF-A est fortement exprimé chez l'adulte dans les poumons, le cœur, les reins et les glandes surrénales. Il est exprimé en moins grande quantité au niveau du foie, de la rate et de la muqueuse gastrique. Le VEGF-A est composé de 8 exons qui donnent naissance à 7 isoformes de VEGF-A composés de 121, 145, 148, 165, 183, 189 et 206 acides aminés obtenus après épissage alternatif du gène du VEGF-A (Hoeben et al., 2004). Le VEGF-A₁₆₅ est le plus important de tous les isoformes, quantitativement et qualitativement. En effet, des souris knockout (KO) hétérozygotes (*Vegf-A*^{+/-}) meurent très tôt lors de l'embryogenèse en raison de la formation immature et d'une dysfonction du système circulatoire (Shibuya, 2011). Parmi les différents types de VEGF, c'est le VEGF-A qui est régulé à la hausse lors de l'hypoxie afin de stimuler l'angiogenèse par un mécanisme dépendant de HIF-

1 α , tel que décrit dans la section précédente. Les autres types de VEGF ne sont pas régulés à la hausse par l'hypoxie (Matsumoto et Claesson-Welsh, 2001). Le VEGF-B est exprimé chez l'adulte dans le myocarde, le muscle squelettique et le pancréas (Hoeben et al., 2004). Les souris VEGF-B KO (*Vegf-B*^{-/-}) n'ont pas de défaut d'angiogenèse, cependant elles montrent un défaut dans la conduction atriale (Shibuya, 2011). Ceci suggère que le VEGF-B n'a de rôle au niveau de l'angiogenèse. Il a été montré que le VEGF-B favorisait la survie des cellules vasculaires, des neurones et des cardiomyocytes en inhibant l'apoptose (Li et al., 2009). Le VEGF-C est exprimé dans le cœur, le placenta, les ovaires, le petit intestin, la glande thyroïde et dans l'embryon où il favorise le bourgeonnement de vaisseaux lymphatiques. Le VEGF-D est exprimé dans les poumon adulte et dans le poumon en développement embryonnaire, le cœur, le muscle squelettique, le colon et le petit intestin (Hoeben et al., 2004). Ces deux types de VEGF vont stimuler la lymphoangiogenèse et vont aussi activer un peu l'angiogenèse. Le VEGF-C est exprimé davantage lors de l'embryogenèse alors que le VEGF-D est plus exprimé après la naissance. Les souris *Vegf-C*^{-/-} ont un phénotype létal causé par une accumulation de fluide en raison du mauvais développement de vaisseaux lymphatiques, phénomène absent chez les souris *Vegf-D*^{-/-} (Alitalo et Carmeliet, 2002). Le VEGF-E provient du virus Orf et aurait la capacité de lier le VEGFR2 seulement et d'induire l'angiogenèse. Le VEGF-F, absent chez l'humain, provient du venin de serpent et augmente la perméabilité vasculaire en se liant au VEGFR1 pour aider à la diffusion du venin dans l'animal mordu (Shibuya, 2011). Finalement, le facteur de croissance placentaire (PlGF) est impliqué au niveau de l'angiogenèse placentaire (Ribatti, 2008).

1.8.1.1 Les récepteurs au VEGF

Il existe trois récepteurs tyrosine kinase pouvant lier les différents isoformes de VEGF soit le VEGFR1 (Flt-1), le VEGFR2 (KDR chez les humains et Flk-1 chez la souris) et le VEGFR3 (Flt-4) (voir figure 13). On retrouve aussi un VEGFR1 soluble (sFlt-1) composé d'un domaine extracellulaire de VEGFR1 composé de 6 domaines extracellulaires similaires à l'immunoglobuline (Ig). Les VEGFR1 et VEGFR2 sont exprimés à la surface des cellules endothéliales vasculaires alors que le VEGFR3 est exprimé à la surface des cellules endothéliales lymphatiques. Le VEGFR1 lie le VEGF-A, le VEGF-B puis le PlGF-1 et le PlGF-2 et (Matsumoto et Claesson-Welsh, 2001). Le VEGFR1 et sa forme soluble agissent en séquestrant le VEGF-A en raison de leur forte affinité pour ce ligand, agissant alors comme régulateur négatif de la

signalisation du VEGF-A. C'est aussi un récepteur ayant une faible activité kinase (Eichmann et Simons, 2012). Le VEGFR2 lie le VEGF-A, le VEGF-C, le VEGF-D et le VEGF-E et il est responsable des effets mitogéniques du VEGF-A en induisant la prolifération, la migration et la survie des CEs vasculaires. La délétion chez des souris du VEGFR2 induit la mort à l'état embryonnaire en raison d'un mauvais développement vasculaire (Shalaby et al., 1995). Le VEGFR3 lie les VEGF-C et VEGF-D et est impliqué dans la lymphoangiogenèse (Matsumoto et Claesson-Welsh, 2001). Ces récepteurs sont composés de 7 domaines extracellulaires similaires à l'immunoglobuline (Ig), d'une seule région transmembranaire et d'un domaine intracellulaire ayant une activité tyrosine kinase (Ortega et al., 1999). De plus, le domaine extracellulaire de VEGFR3 est composé de 2 peptides liés ensemble par des ponts disulfures (Pajusola et al., 1994). On retrouve aussi les neuropiline-1 (NRP1) et neuropiline-2 (NRP2) qui sont des récepteurs accessoires sans activité kinase et dont le rôle est de renforcer la signalisation de VEGFR2. Les NRP1 et NRP2 vont lier le VEGF-A, le VEGF-B, le VEGF-E et le PlGF-2. La neuropiline-1 lie le VEGF-A et lorsqu'elle co-exprimée avec VEGFR2, elle augmente de 4 à 6 fois la liaison de VEGF-A à VEGFR2. Il existe aussi un autre récepteur accessoire nommé protéoglycane à héparane sulfate (HSPG) liant le VEGF-A. Le HSPG lequel augmente la liaison de VEGF-A au VEGFR et sert de réserve de VEGF-A (Hoeben et al., 2004; Matsumoto et Claesson-Welsh, 2001). La liaison du VEGF au VEGFR induit son homodimérisation/hétérodimérisation ce qui active les tyrosines kinase produisant alors l'autophosphorylation des résidus tyrosine dans le domaine intracellulaire du VEGFR. Ces phosphotyrosines ainsi que les acides aminés environnant créent des sites de liaison pour des protéines adaptatrices ayant un domaine SH2 permettant alors la transduction de signal (Simons et al., 2016).

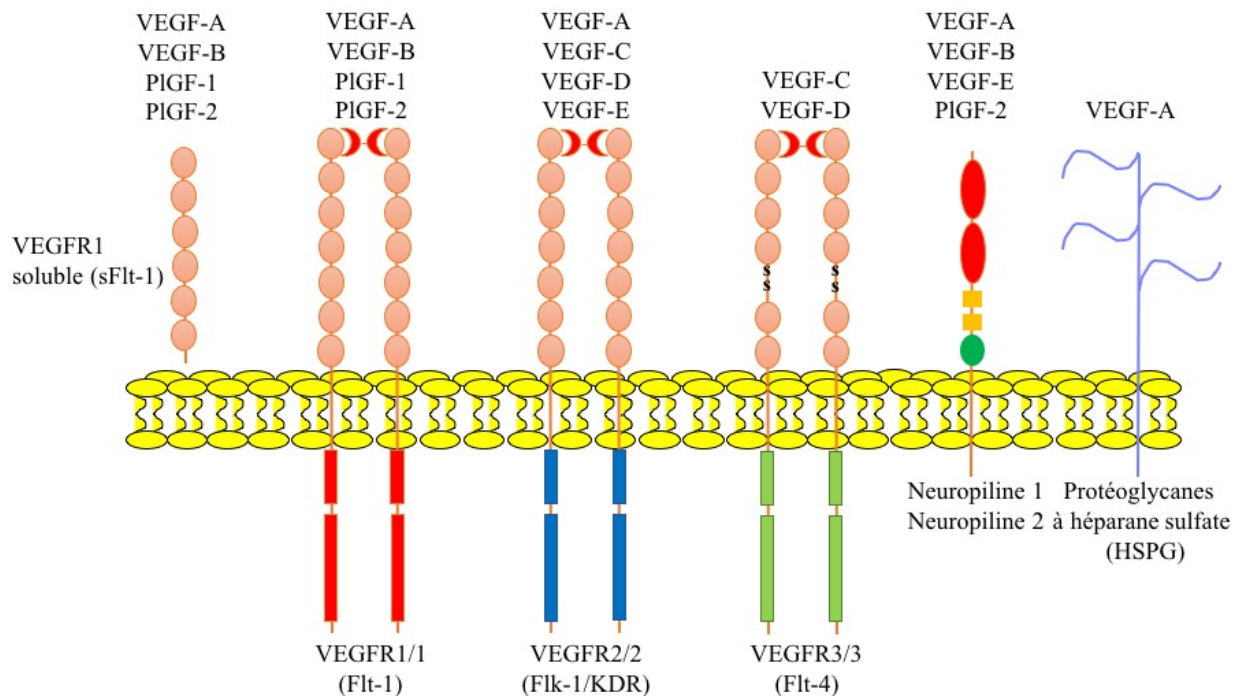


Figure 13 : Les récepteurs au VEGF et leurs ligands

Les récepteurs au VEGF sont des récepteurs qui ont une activité tyrosine kinase intrinsèque. Le VEGFR1 (Flt-1) présente une forme soluble (sFlt-1). Le VEGFR1 peut lier VEGF-A, VEGF-B, PIGF-1 et PIGF-2 et il aurait un effet inhibiteur sur la signalisation du VEGFR2 en séquestrant le VEGF-A. Le VEGFR2 (Flk-1 chez la souris et KDR chez l'homme) peut lier VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D et VEGF-E et est impliqué dans le processus angiogénique. Le VEGFR3 (Flt-4) peut lier VEGF-C et VEGF-D et a un rôle important dans la lymphoangiogenèse. Les récepteurs accessoires neuropiline 1 (NRP1) et neuropiline 2 (NRP2) ont pour ligands VEGF-A, VEGF-B, VEGF-E et PIGF-2 et sont responsables de renforcer la signalisation de VEGFR2. Le récepteur accessoire nommé protéoglycanes à héparane sulfate (HSPG) lie le VEGF-A puis augmente sa liaison au VEGFR et sert de réserve de VEGF-A (adapté de Hoeben et al., 2004 ; Matsumoto et Claesson-Welsh, 2001).

1.8.1.2 La signalisation du VEGF-A

La liaison du VEGF-A au VEGFR2 provoque l'autophosphorylation sur les résidus Tyr951 et Tyr996 du domaine kinase d'insertion, sur les résidus Tyr1054 et Tyr1059 du domaine kinase puis sur les résidus Tyr1175 et Tyr1214 de la queue c-terminale. La phosphorylation de la Tyr1175 permet de recruter la phospholipase C γ 1 (PLC γ 1) qui active la protéine kinase C (PKC). La PKC active par la suite Ras qui est responsable de l'activation de la voie la kinase extracellulaire régulée par le signal (ERK). Une fois activé, ERK va migrer au noyau puis phosphoryler et activer des facteurs de transcriptions dont c-Jun et c-fos et induire la prolifération cellulaire. VEGFR2 va aussi mener à l'activation de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) ce qui va augmenter la quantité de

phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate (PIP₃) menant à l'activation de la protéine kinase B (Akt/PKB), de eNOS et de Rac. Akt/PKB favorise la survie cellulaire en inhibant le promoteur létal homologue associé aux cellules bêta du lymphome de type 2 (BAD) et la caspase 9. L'activation de la eNOS provoque une production de NO. Le NO et Rac vont augmenter la perméabilité vasculaire et favoriser la migration cellulaire. L'activation de p38MAPK et de la kinase d'adhésion focale (FAK) et de son substrat paxiline permet la réorganisation du cytosquelette et favorise la migration cellulaire (Hoeben et al., 2004; Matsumoto et Claesson-Welsh, 2001).

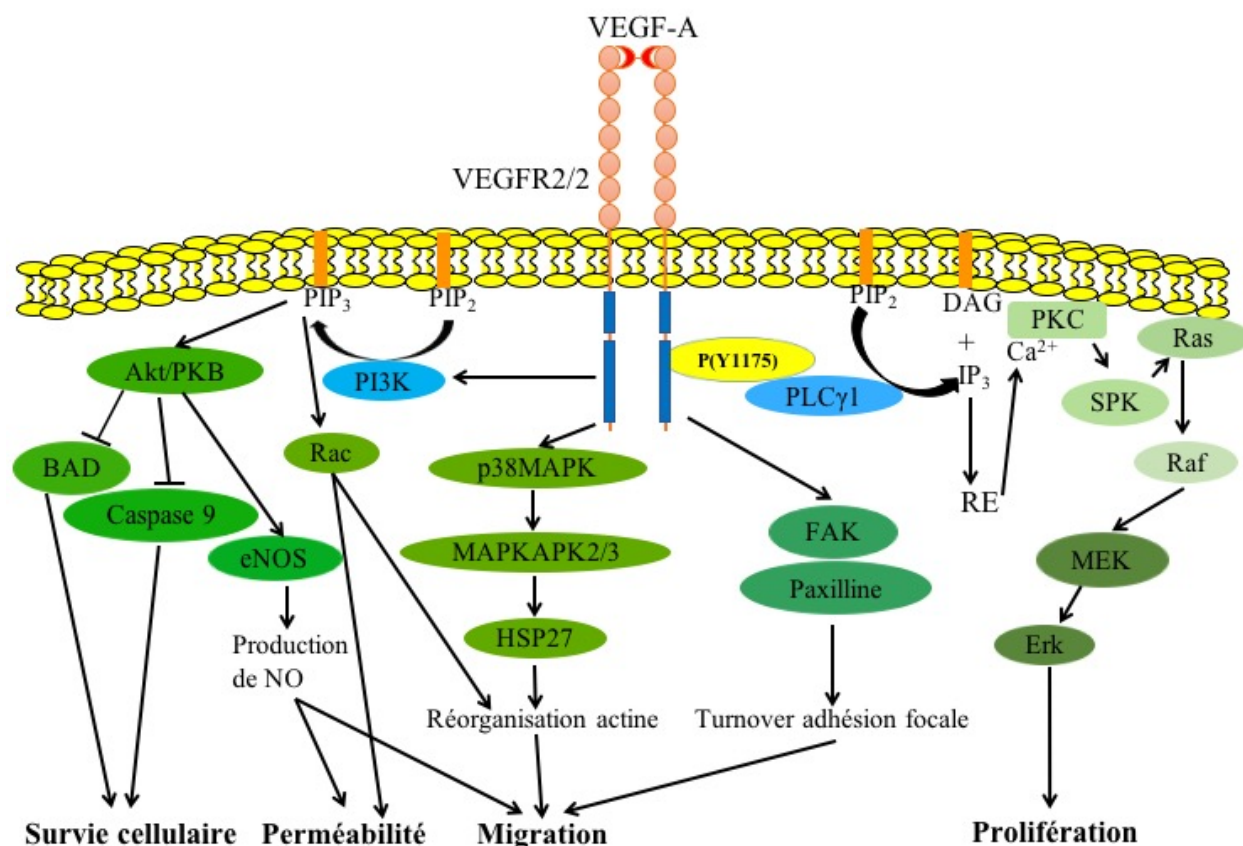


Figure 14 : La signalisation de VEGFR2/2 et de son ligand VEGF-A

La liaison du VEGF-A à son récepteur VEGFR2 va provoquer son homodimérisation et son autophosphorylation créant des sites de liaison pour des protéines adaptatrices. La PLCγ1 est activée ce qui permet de recruter Erk favorisant la prolifération cellulaire. L'activation de PI3K permet d'augmenter les niveaux de PIP₃ activant Akt qui favorise la survie cellulaire. Akt active aussi eNOS qui promeut la perméabilité et la migration cellulaire par la production de NO. Le PIP₃ active aussi Rac qui augmente la perméabilité et qui favorise la migration par son effet sur la réorganisation d'actine. L'activation de p38MAPK, de FAK et son substrat paxiline vont induire la migration cellulaire (Adapté de Hoeben et al., 2004; Matsumoto et Claesson-Welsh, 2001).

1.8.2 *Le PDGF*

Le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) a été découvert initialement dans les plaquettes (Ross et al., 1990). Le PDGF est un dimère de 30 kDa composé des chaînes A, B, C et D. Il existe 5 compositions dimériques : PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB, PDGF-CC et PDGF-DD. On compte deux récepteurs au PDGF de type tyrosine kinase, le PDGFR- α et le PDGFR- β . Individuellement, les chaînes de PDGF ont des affinités différentielles pour les deux récepteurs. Le PDGFR- α a une grande affinité pour PDGF-A, PDGF-B et PDGF-C tandis que le PDGFR- β lie avec grande affinité le PDGF-B et le PDGF-D. La signalisation du PDGF ressemble à celle du VEGF : la liaison du PDGF au récepteur va induire sa dimérisation activant des domaines tyrosines kinase intrinsèque permettant le recrutement de protéines contenant des domaines SH2 favorisant la migration et prolifération cellulaire. Les PDGF-B et son récepteur PDGFR- β sont impliqués dans le processus angiogénique (Raica et Cimpean, 2010). Le PDGF-B est produit par les CEs en développement ou quiescentes et le PDGFR- β est exprimé à la surface des cellules murales et des CEs (Uutela et al., 2001). En absence de cet effet paracrine, les cellules murales ne sont plus recrutées. De ce fait, les CEs prolifèrent de manière irrégulière menant à des hémorragies et à une mauvaise formation de vaisseaux (Shih et Holland, 2006). Il a été montré en essai *in vitro* que le PDGF-B induit la prolifération, la migration, la formation de tubules et la sécrétion de VEGF au niveau des CEs. Le PDGF a un rôle primordial dans le maintien de l'intégrité et de la stabilité des vaisseaux en recrutant les cellules murales exprimant PDGFR- β (Raica et Cimpean, 2010). Une étude a montré que l'implication de PDGFR- β dans l'induction de l'angiogenèse. En effet, le PDGFR- β est localisé sur les CEs des bourgeons et tubules et son expression augmente avec le nombre de tubules formés. La neutralisation du PDGF-B a réduit la formation de tubules dans des cellules endothéliales d'aorte (Battegay et al., 1994). Le rôle de PDGF-B/PDGFR- β dans le développement vasculaire a été établi par des études utilisant des souris KO pour PDGF-B et PDGFR- β . Ces souris meurent en période périnatale en raison de vaisseaux non-fonctionnels au niveau de plusieurs organes (Levéen et al., 1994; Soriano, 1994).

1.8.3 *L'angiopoïétine*

La signalisation de l'angiopoïétine est la seconde voie de signalisation impliquant des récepteurs tyrosine kinase spécifique aux CEs identifiée après celle du VEGF et de son récepteur, le VEGFR. Cette voie comprend deux types de récepteurs tyrosine kinase avec domaines d'homologies Ig et

EGF (Tie) soit les Tie-1 et Tie-2 (Augustin et al., 2009). Les récepteurs Tie sont exprimés dans les CEs des vaisseaux sanguins et lymphatiques (Eklund et al., 2016). Leurs ligands sont l'angiopoïétine 1 (Ang1), l'angiopoïétine 2 (Ang2), l'angiopoïétine 3 (Ang3) et l'angiopoïétine 4 (Ang4). L'Ang 3 et 4 n'ont pas d'effet connu sur l'angiogenèse (Augustin et al., 2009). La voie de l'angiopoïétine est indispensable pour le recrutement de cellules murales et le remodelage des vaisseaux au cours du développement embryonnaire d'une part et lors de l'homéostasie des vaisseaux d'autre part. L'Ang1 est exprimée par les cellules murales (péricytes et CMLv) et les fibroblastes. L'expression d'Ang1 est stimulée dans les cellules murales par l'hypoxie ou sous l'action du VEGF-A et du PDGF-B. L'Ang2 est exprimée par les CEs et son expression peut être augmentée par le VEGF-A et l'hypoxie. Comme nous l'avons vu dans le mécanisme de l'angiogenèse (voir figure 10), l'Ang2 n'est pas beaucoup exprimée dans les vaisseaux quiescents, mais son expression augmente lorsque le processus angiogénique débute (Fagiani et Christofori, 2013). La liaison de l'Ang1 au récepteur Tie-2 engendre la dimérisation du récepteur puis l'autophosphorylation de 5 résidus tyrosine dans le domaine kinase intracellulaire provoquant l'activation de la PI3K et d'Akt/PKB permettant la survie cellulaire et la production de NO. La voie des protéines kinases activées par un mitogène (MAPK) est aussi recrutée par lors de la signalisation de Tie-2 (Jones et al., 1999, 2003). En somme, l'activation de cette voie de signalisation favorise la survie et quiescence des CEs de même que l'étanchéité du vaisseau (Fagiani et Christofori, 2013). L'Ang2 se lie aussi au récepteur Tie-2 avec une affinité plus faible que l'Ang1 et serait toutefois un agoniste partiel/antagoniste du récepteur Tie-2, causant le déplacement d'Ang1 (Yuan et al., 2009). L'effet physiologique de l'Ang2 dépend de la présence de VEGF. En présence de VEGF, l'Ang2 favorise l'angiogenèse tandis qu'en absence de VEGF, l'Ang2 provoque la régression et déstabilisation du vaisseau (Jain, 2003). Le rôle de Tie-2 dans l'angiogenèse a été caractérisé dans des modèles murins ayant une délétion du gène de Tie-2. Cette délétion était létale à l'état embryonnaire en raison d'hémorragies, de défauts vasculaires et d'insuffisance cardiaque (Dumont et al., 1994; Sato et al., 1995).

1.8.4 SDF-1

Le SDF-1 pour *stromal derived factor-1* ou CXCL12 est une chimiokine qui se lie à son récepteur CXCR4, un récepteur couplé aux protéines G (GPCR) et qui a un rôle dans l'hématopoïèse et aussi dans la formation de vaisseaux (Yu et al., 2006). La grande majorité des chimiokines vont lier beaucoup de récepteurs afin d'assurer la fonction cellulaire, cependant SDF-1 ne se lie qu'à

CXCR4 et ce dernier est l'unique récepteur de SDF-1 (Ceraadini et Gurtner, 2005). SDF-1 joue un rôle primordial dans le développement embryonnaire où il induit la différenciation et prolifération de cellules progénitrices (Cinamon et al., 2001). Chez l'adulte, SDF-1 maintient l'homéostasie tissulaire et assure la survie et transport des cellules immunitaires. On retrouve 6 différents isoformes de SDF-1. Les plus exprimés et retrouvés de façon ubiquitaire dans les tissus et organes sont CXCL12 α et CXCL12 β (Pozzobon et al., 2016). Le rôle de cette chimiokine dans le développement a été démontré. Des souris ayant une délétion de SDF-1 et de CXCR4 présentent un phénotype létal. En effet les souris ayant une délétion de CXCR4 montrent une vascularisation du système gastro-intestinal réduite et anormale (Tachibana et al., 1998), une réduction des cellules B progénitrices et une malformation cardiaque (Nagasawa et al., 1996). L'hypoxie est impliquée dans le recrutement des cellules progénitrices endothéliales (EPCs) au site ischémique sous l'effet de SDF-1 et du récepteur CXCR4 (Ceraadini et Gurtner, 2005). Tel que discuté aux sections 1.6.3 et 1.7.1 et montré à la figure 9, l'hypoxie augmente l'expression de SDF-1 par HIF-1 α ce qui provoque une augmentation du recrutement d'EPCs exprimant CXCR4 (Ceraadini et al., 2004). Une étude expérimentale a démontré l'importance de la voie de CXCR4/SDF-1. La voie de CXCR4 et SDF-1 a été bloquée dans un modèle murin d'ischémie. En effet, le blocage de CXCR4 des cellules progénitrices infusées dans l'animal ou le blocage de SDF-1 dans la circulation du modèle murin a mené à une réduction dans le nombre d'EPCs infusées recrutées au tissu ischémique. Une réduction de la néovascularisation et du flot sanguin en réponse à l'ischémie a aussi été observée (Ceraadini et Gurtner, 2005).

1.8.5 Effet du diabète sur les facteurs angiogéniques

Tel que discuté à la section 1.7.2, l'hyperglycémie altère les fonctions de HIF-1 α ce qui provoque la réduction de l'expression de facteurs pro-angiogéniques (Bento et Pereira, 2011). Tout d'abord, l'activité de la eNOS est diminuée lorsque des cellules endothéliales d'aorte bovines (BAEC) exposées à des concentrations élevées de glucose (Du et al., 2001). Les niveaux de cellules progénitrices endothéliales ont été mesurés chez des patients diabétiques atteints de MAP, ceux-ci étaient diminués en comparaison aux sujets sains (Bitterli et al., 2016). Les niveaux de VEGF étaient réduits dans le muscle ischémique de souris diabétiques en comparaison aux souris contrôles (Rivard et al., 1999; Thangarajah et al., 2009). Cette baisse d'expression du VEGF était associée à une réduction de la revascularisation du muscle ischémique chez les souris diabétiques

(Rivard et al., 1999). Notre laboratoire a aussi montré une réduction de la revascularisation du membre ischémique chez des souris diabétiques 4 semaines suivant une ligature de l'artère fémorale. De plus, l'expression du VEGF (ARNm) et la phosphorylation du récepteur au VEGF (p-VEGFR2) était diminuée dans le muscle ischémique des souris diabétiques (Lizotte et al., 2013). Les niveaux d'expression de VEGFR1 et de VEGFR1 soluble sont augmentés dans le muscle squelettique ischémique de souris diabétiques de type 2, pouvant expliquer la réduction des effets du VEGF sur l'angiogenèse (Hazarika et al., 2007). L'expression de PDGF-BB était réduite dans le muscle ischémique des souris diabétiques de type 1 (Lizotte et al., 2013; Tani et al., 2006), de même que l'activité du récepteur au PDGF (PDGFR- β) (Lizotte et al., 2013). Chez des souris diabétiques de type 2, l'expression de Tie-2 était réduite et le recrutement de CMLv induit par l'Ang1 était altéré de même que la formation de vaisseaux (Chen et Stinnett, 2008). De plus, la différenciation de cellules progénitrices issues de la moelle osseuse en cellules endothéliales sous l'effet de SDF-1 ainsi que la phosphorylation d'Akt était inhibée chez des souris diabétiques de type 1. Ceci pourrait expliquer la mauvaise revascularisation du muscle ischémique chez les souris diabétiques (De Falco et al., 2009). Ces résultats montrent que l'hyperglycémie provoque une dérégulation des facteurs angiogéniques contribuant à la mauvaise revascularisation en présence d'hypoxie. Les mécanismes cellulaires responsable de ce désordre ont été discutés à la section 1.2.

1.8.6 Stratégies thérapeutiques impliquant les facteurs angiogéniques

Les thérapies disponibles pour traiter la MAP sont à ce jour peu nombreuses. Différents essais cliniques furent réalisés à ce jour et cette section traitera de ceux-ci et de leurs effets sur la MAP. Tout d'abord, des essais cliniques testant des thérapies à base de protéines dont le bFGF (*basic fibroblast growth factor*) pour traiter la MAP ont été réalisées. Une étude de phase I dans laquelle des patients atteints de claudication intermittente ont reçu des injections dans l'artère fémorale de bFGF a montré une amélioration du flot sanguin dans les muscles gastrocnémiens (Lazarous et al., 2000). Une étude de phase II testant l'administration intraveineuse de bFGF sur des patients avec MAP et claudication intermittente a dû être arrêtée en raison de la protéinurie engendrée par cette thérapie, bien que la dose totale injectée fût inférieure à l'étude de phase I précédente. Aucun effet positif n'a été observé à la cessation de l'étude (Cooper et al., 2001). L'étude TRAFFIC, la plus grande étude de phase II impliquant injection intra-artérielle de bFGF a montré une augmentation du temps de marche maximale et de l'indice tibio-brachial (ABI) ou indice de pression systolique

bras-cheville (IPSCB) chez des patients atteints de claudication intermittente à 90 jours (Lederman et al., 2002). Bien que ces thérapies aient montré une amélioration des symptômes reliés à la MAP, l'efficacité était faible en raison de la quantité négligeable de facteurs de croissance atteignant les tissus ischémiques.

Ainsi, l'administration de facteurs de croissance par thérapie génique apparaîtrait comme une alternative à la thérapie à base de protéines afin d'avoir une surexpression soutenue et locale dans les tissus affectés chez les patients atteints de MAP (Grochot-Przeczek et al., 2013). La plupart des thérapies géniques pour l'ischémie du membre inférieur ont utilisé le VEGF. Une première étude administrant en intra-artériel un plasmide codant pour VEGF₁₆₅ dans un polymère d'hydrogel enrobant un ballon d'angioplastie a permis d'augmenter le nombre de vaisseaux collatéraux et la perfusion sanguine. Ces effets ont persisté jusqu'à 12 semaines (Isner et al., 1996).

Des études de phase I ont montré que l'administration d'un plasmide codant pour VEGF₁₆₅ en intramusculaire permettait d'induire le développement de vaisseaux collatéraux (Baumgartner et al., 1998; Isner et al., 1998; Shyu et al., 2003).

Une étude randomisée contrôlée avec placebo à double aveugle (phase I et II) a montré à la suite de l'administration intramusculaire de VEGF sous forme de plasmide une augmentation de l'ABI, une amélioration de la guérison d'ulcères, une amélioration de l'apparence de la peau, mais n'a pas permis de réduire le taux d'amputation (Kusumanto et al., 2006).

Une étude de phase II a étudié l'effet de l'administration d'un vecteur adénoviral codant pour VEGF₁₆₅ et a montré une amélioration de la vascularisation en comparaison au groupe contrôle. Par contre, il n'y avait pas de différence dans le taux d'amputation et la guérison d'ulcères (Mäkinen et al., 2002).

L'administration d'un vecteur adénoviral codant pour VEGF₁₂₁, contrairement au VEGF₁₆₅, n'a eu aucun effet sur le temps de marche maximal, sur l'ABI, sur le temps de début de la claudication et n'a pas contribué à améliorer la qualité de vie en général (Rajagopalan et al., 2003).

Les études de phase I ont montré des effets bénéfiques, mais n'avait pas de groupe traité par placebo. Les études de plus grande envergure (phase II) n'ont pas toujours montré de bénéfice en globalité de la thérapie génique avec VEGF en comparaison au placebo. Une méta-analyse réalisée sur ces études de phase II susmentionnées portant sur la thérapie génique avec VEGF et l'étude TRAFFIC portant sur la thérapie avec bFGF a montré qu'il n'y avait aucune différence entre le groupe placebo et le groupe traité, indépendamment de la dose donnée lors de la thérapie génique (Ylä-Herttuala et al., 2004). Il y a donc de l'optimisation à faire lors de la thérapie génique quant à la méthode d'administration, aux doses et à la durée du traitement afin d'induire une revascularisation optimale (Grochot-Przeczek et al., 2013). L'efficacité d'une thérapie utilisant des cellules progénitrices a également été étudiée chez des patients ayant une ischémie du membre inférieur. L'injection intramusculaire de cellules progénitrices provenant de la moelle osseuse a montré une augmentation de l'ABI, une augmentation de la distance de marche sans douleur et une meilleure oxygénation des tissus (Tateishi-Yuyama et al., 2002). Bien que de nombreuses études aient montré un effet bénéfique de la thérapie cellulaire sur la MAP, une méta-analyse conclut que des études de meilleures qualités contrôlées avec placebo doivent être réalisées. De plus, cette méta-analyse ajoute que la thérapie cellulaire autologue a le potentiel de modifier l'historique naturel de l'ischémie critique du membre inférieur (Rigato et al., 2017).

1.9 Les protéines tyrosine phosphatases

Une façon de réguler la signalisation du récepteur au VEGF (voir figure 14), membre de la famille des récepteurs tyrosines kinases (RTKs), est en déphosphorylant les résidus tyrosines phosphorylés (Lorenz, 2009). Les protéines tyrosine phosphatases (PTPs) sont impliquées dans la régulation de processus cellulaires incluant la signalisation, la prolifération cellulaire, la migration cellulaire et la différenciation cellulaire (Kappert et al., 2005). Le génome humain contient environ 125 PTPs (Corti et Simons, 2017). On compte les PTPs classiques qui ne reconnaissent que les résidus tyrosine phosphorylés (p-Tyr) et sont divisées en PTPs de type récepteur (PTPR) localisés à la membrane et en PTPs non-récepteurs (PTPN) qui ont une localisation intracellulaire. Les PTPRs comprennent un domaine extracellulaire responsable de la liaison du ligand ou de l'interaction avec des composantes de la matrice extracellulaire et le domaine catalytique est localisée dans la partie intracellulaire de la PTPR. Quant à elles, les PTPNs sont retrouvées dans le cytosol ou liées à la membrane intracellulaire de différents compartiments. Les PTPNs contiennent des domaines

importants pour réguler leurs fonctions. Les PTPs qui seront discutées dans ce mémoire sont la protéine tyrosine phosphatase endothéliale (VE-PTP), une PTP de type récepteur, et les PTP intracellulaires dont la protéine tyrosine phosphatase 1B (PTP1B), la protéine tyrosine phosphatase contenant le domaine SH2-1 (SHP-1) et la protéine tyrosine phosphatase contenant le domaine SH2-2 (SHP-2) (Corti et Simons, 2017). Leurs rôles dans la régulation du VEGFR2 seront discutés.

1.9.1 SHP-1

SHP-1 est une PTP d'environ 68 KDa provenant du gène *PTPN6* localisé sur le chromosome 12p13. Cette PTP a été découverte dans les cellules hématopoïétiques et est aussi exprimé dans les cellules épithéliales. On compte deux isoformes de SHP-1 provenant d'un épissage alternatif de son gène. La forme longue de SHP-1, SHP-1L, est plus longue de 29 acides aminés en C-terminal. De plus, SHP-1 L ne peut être phosphorylé sur la Y564, mais possède la Y536. SHP-1L a un motif riche en proline en C-terminal pouvant lier des protéines ayant des domaines SH3 (Lorenz, 2009). Initialement, le rôle de SHP-1 dans la signalisation de VEGFR2 a été proposé en raison de son association avec VEGFR2 suite à une stimulation au VEGF-A (Kroll et Waltenberger, 1997). D'autres études ont confirmé le rôle de SHP-1 dans la signalisation du VEGFR2. La délétion de SHP-1 dans des cellules endothéliales de veine ombilicale humaine (HUVECs) augmente la phosphorylation en tyrosine 1175 de VEGFR2 et la prolifération cellulaire suite à une stimulation au VEGF-A, mais n'a pas d'effet sur la migration cellulaire (Bhattacharya et al., 2008). Le rôle de SHP-1 est important, puisque des souris ayant une ablation de SHP-1 (souris *motheaten*) montrent une inflammation systémique chronique et meurent de pneumonie interstitielle généralement 3 semaines suivant la naissance (Shultz et Sidman, 1987; Tsui et al., 1993). Par ailleurs, l'ablation de SHP-1 par l'injection d'un petit ARN interférent (siRNA) dans un modèle d'ischémie du membre inférieur chez le rat a permis d'augmenter la densité en capillaires, suggérant le rôle de SHP-1 dans la signalisation de VEGFR2 et au niveau de l'angiogenèse *in vivo* (Sugano et al., 2007). Tel que discuté à la section 1.2.5, SHP-1 serait activée par la PKC- δ en hyperglycémie menant à une inhibition des signaux pro-angiogéniques du VEGF et PDGF contribuant à la dysfonction endothéliale.

1.9.1.1 Structure et activation de SHP-1

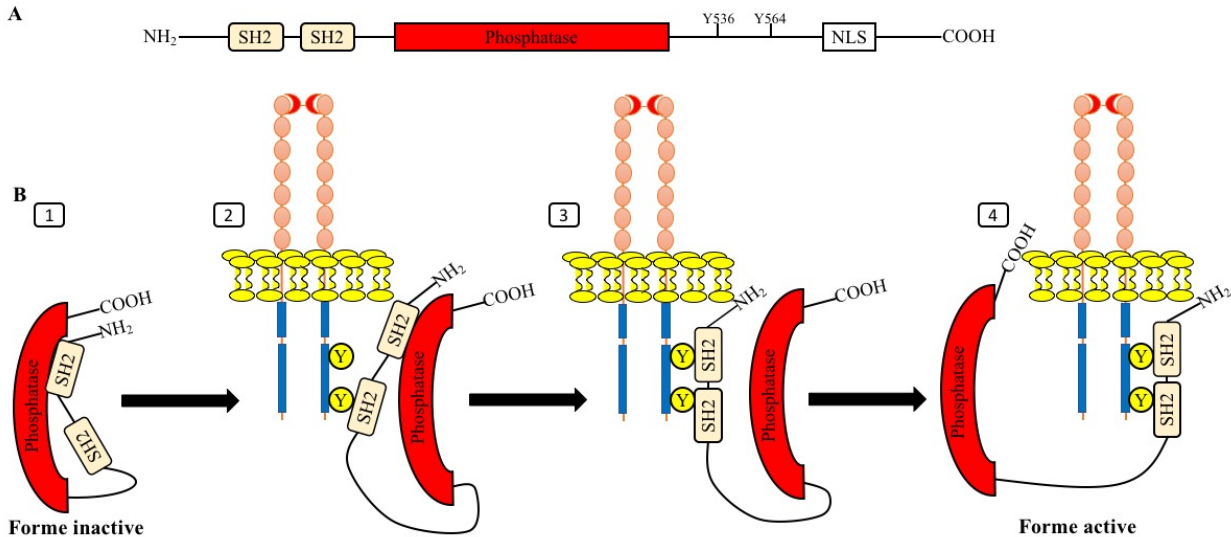


Figure 15 : Structure et activation de SHP-1

A) SHP-1 possède 2 domaines SH2 en N-terminal, un domaine catalytique central possédant l'activité phosphatase, des résidus tyrosines pouvant être phosphorylés en C-terminal augmentant l'activité catalytique de SHP-1 et un signal de localisation nucléaire (NLS) situé en C-terminal. B) SHP-1 est sous sa forme inactive lorsque le domaine SH2 N-terminal lie le domaine catalytique. La liaison des 2 domaines SH2 aux tyrosines phosphorylées induisent un changement conformationnel de SHP-1 permettant la libération du domaine phosphatase et son activité (adapté de Wang et al., 2011).

SHP-1 est composé d'un domaine catalytique central lui conférant son activité phosphatase, de deux domaines SH2 situés dans la partie N-terminale pouvant lier des résidus tyrosines phosphorylés. La partie C-terminale comprend le signal de localisation nucléaire assurant la translocation de SHP-1 au noyau sous l'influence de cytokines ou d'une stimulation avec facteur de croissance dont le facteur de croissance épidermique (EGF) dans les cellules non-hématopoïétiques. La partie C-terminale contient aussi des résidus tyrosines 536 et 564 pouvant être phosphorylés (Lorenz, 2009). La phosphorylation de ces résidus tyrosines augmenterait l'activité catalytique de SHP-1 (Lorenz et al., 1994; Yoshida et al., 1999). Un modèle hypothétique d'activation de SHP-1 a été proposé. En conformation inactive, le domaine SHP-2 le plus près de la partie N-terminale est lié au domaine catalytique, résultant en une inhibition de l'activité catalytique de SHP-1. Une fois que le domaine SH2 le plus C-terminal lie un résidu tyrosine phosphorylé, il y a un changement de conformation de la protéine permettant la libération du deuxième domaine SH2 et du domaine catalytique. Ainsi, SHP-1 peut alors lier un second résidu

tyrosine phosphorylé provoquant un changement de conformation permettant à la protéine d'acquérir une conformation active et de déphosphoryler son substrat (Wang et al., 2011).

1.9.2 SHP-2

SHP-2 est aussi une PTP exprimée de façon ubiquitaire. Tout comme SHP-1, cette PTP possède deux domaines SH2 en N-terminal permettant de lier des tyrosines phosphorylées tel qu'illustré à la figure 15. SHP-2 serait une PTP jouant un rôle de régulation positive de la voie de signalisation ERK. En absence de SHP-2, on observe une activation moindre de ERK en aval des RTKs (Corti et Simons, 2017). Une autre étude a montré un résultat plutôt inverse. En effet, l'activation de ERK1/2 suite à une stimulation au VEGF-A est augmentée lors de l'ablation de SHP-2 dans des HUVECs alors qu'une réduction de l'activation d'Akt a été observée (Ha et al., 2008). De plus, SHP-2 serait primordiale pour activer Akt et provoquer la migration cellulaire induite par le VEGF (Laramé et al., 2007). Dans un même ordre d'idée, SHP-2 favoriserait la survie cellulaire par son action sur la voie PI3K/Akt (Hakak et al., 2000; Zito et al., 2004). Le rôle de SHP-2 est important au niveau de l'endothélium afin de favoriser son intégrité, car il permet de réduire le niveau de phosphorylation basale des protéines de jonction (Grinnell et al., 2010; Hatanaka et al., 2012). Il a été montré que SHP-2 s'associe avec VEGFR2 suite à une stimulation au VEGF-A (Kroll et Waltenberger, 1997) et que SHP-2 déphosphoryle VEGFR2 lorsqu'il est immunoprécipité (Mitola et al., 2006). La délétion de SHP-2 dans des HUVECs augmente la phosphorylation de VEGFR2 induite par VEGF-A (Sinha et al., 2009). Par ailleurs, la surexpression d'une forme dominante-négative de SHP-2 a mené à une augmentation de la phosphorylation de VEGFR2 suite à une stimulation au VEGF-A et à une augmentation de la migration cellulaire dans des CEs (Mitola et al., 2006).

1.9.3 PTP1B

PTP1B est une PTP avec expression ubiquitaire. Elle est ancrée à la membrane réticulum endoplasmique avec son domaine catalytique dirigé vers le cytosol (Stuible et Tremblay, 2010). Cette PTP possède comme substrat le VEGFR2, le récepteur à l'insuline et la β -caténine (Corti et Simons, 2017). Une étude a montré que la surexpression de PTP1B dans des CEs inhibe la phosphorylation de VEGFR2, de ERK1/2 de même que la prolifération induite par le VEGF alors que l'ablation de PTP1B avec siRNA mène à une augmentation des effets du VEGF sur les

phénomènes susmentionnés, montrant l'implication de PTP1B dans la régulation de la signalisation de VEGFR2 dans les CEs. De plus, il a aussi été montré que PTP1B peut déphosphoryler VEGFR2 immunoprécipité à partir de HUVECs. Par ailleurs, la surexpression de PTP1B stabilise l'adhésion cellulaire par les VE-cadhérines en réduisant leur phosphorylation en tyrosine alors que l'ablation de PTP1B avec siRNA a permis d'augmenter la perméabilité endothéliale. De surcroît, l'expression de PTP1B était augmentée dans un modèle murin d'ischémie du membre inférieur. Ainsi, PTP1B pourrait contribuer à réduire la signalisation du VEGF2 lors de l'angiogenèse (Nakamura et al., 2008). Des CEs isolées de souris *Ptp1b*^{-/-} ont montré une augmentation de l'activation du VEGFR2 induite par VEGF-A de même qu'une augmentation des effets mitogéniques du VEGF au niveau du bourgeonnement vasculaire, de la prolifération et migration cellulaire. De plus, des souris *Ptp1b*^{-/-} spécifiquement dans les CEs ont montré une augmentation de l'angiogenèse rétinienne, une guérison de plaies plus rapide dénotant une meilleure angiogenèse et une meilleure revascularisation du membre ischémique suite à une ligature de l'artère fémorale en comparaison aux souris contrôles (Lanahan et al., 2014). Des souris ayant une délétion homozygote de PTP1B ont une meilleure sensibilité à l'insuline et une résistance à l'obésité (Elchebly et al., 1999; Klamann et al., 2000). Ces souris ont aussi une meilleure angiogenèse au niveau des plaies associée avec une meilleure fermeture de la plaie (Zhang et al., 2015). Une étude clinique a montré qu'un inhibiteur de PTP1B a permis, chez des patients diabétiques de type 2, une meilleure régulation du glucose et une réduction des niveaux de LDL (He et al., 2014).

1.9.4 VE-PTP

VE-PTP est une PTPR spécifique aux cellules endothéliales. Elle est aussi appelée hPTP-β ou R-PTPβ (Bäumer et al., 2006; Fachinger et al., 1999). VE-PTP possède plusieurs substrats dont le récepteur Tie-2, VE-Cadhérine, γ-caténine et VEGFR2 (Corti et Simons, 2017). Une étude a montré que l'inactivation de VE-PTP dans des corps embryonnaires de souris a mené à la formation excessive de bourgeons vasculaires et de filopodes en raison de la phosphorylation persistante de la tyrosine 1175 du VEGFR2 en réponse au VEGF-A dans les cellules de tige. Ceci a mené à une augmentation de la prolifération des CEs. Ceci montre le rôle de VE-PTP dans les cellules de tige maintient le VEGFR2 dans un état peu actif en raison de sa déphosphorylation par

VE-PTP. Cette même étude a montré que des corps embryonnaires *VE-PTP^{-/-}* montraient une mauvaise formation de la lumière des vaisseaux associée à la désorganisation de la podocalyxine, un marqueur intraluminal. Ce phénomène pouvait être prévenu par la réduction des niveaux de VEGF-A, suggérant une hyperactivité de VEGFR2 en absence de VE-PTP (Hayashi et al., 2013). Des souris déficientes pour VE-PTP meurent à l'état embryonnaire en raison de problèmes vasculaires incluant un mauvais branchement du plexus vasculaire, des défauts cardiaques et des vaisseaux sanguins peu fonctionnel dans le sac vitellin (Bäumer et al., 2006; Dominguez et al., 2007). Dans l'endothélium mature, VE-PTP forme un complexe avec VE-cadhérine maintenant cette dernière non-phosphorylée permettant l'étanchéité de l'endothélium (Nawroth et al., 2002; Nottebaum et al., 2008). Ce complexe est destabilisé par la liaison du VEGF-A au VEGFR2 (Nottebaum et al., 2008). Notamment, l'induction de la perméabilité vasculaire induite par VEGF-A est absente chez des souris *knock-in* dans lesquelles VE-PTP et VE-cadhérine ne peuvent dissocier (Broermann et al., 2011).

OBJECTIFS

Les objectifs de mon projet de recherche étaient :

- D'étudier les voies de signalisation et les effets pro-angiogéniques du VEGF dans les BAEC en condition élevée de glucose et faible en oxygène
- D'étudier le rôle de SHP-1 sur les voies de signalisation et effets mitogéniques du VEGF dans les BAEC en surexprimant une forme dominante-négative de SHP-1 en condition élevée de glucose et faible en oxygène

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Les cellules endothéliales d'aortes bovines (BAEC)

Une culture primaire de cellules endothéliales d'aortes bovines ou BAEC a été utilisée pour toutes les expérimentations *in vitro*. En effet, les BAEC sont un modèle de choix quant à l'étude de tous les aspects des fonctions cardiovasculaires et maladies associées dont les complications vasculaires du diabète. Elles permettent également d'étudier les voies de signalisation du VEGF et les effets mitogéniques du VEGF sur l'angiogenèse, la migration cellulaire et la prolifération cellulaire. En addition, il s'agit d'un type cellulaire facile à extraire et à mettre en culture (Sigma-Aldrich, 2018).

2.1.1 Extraction des BAEC

Les BAEC sont extraites à partir des aortes de veaux obtenues à l'abattoir régional de Coaticook. Nous avons utilisé des aortes de veaux pour leurs propriétés prolifératives, car les cellules bovines adultes peuvent devenir sénescents. Afin de diminuer le risque de contamination, l'extraction s'effectue dans une enceinte de sécurité biologique (ESB). Les instruments nécessaires à l'extraction sont stérilisés sous les UV dans l'ESB. En premier lieu, une portion de l'aorte descendante d'environ 20 cm est utilisée. Cette portion est ensuite dégraissée à l'aide de ciseaux afin d'éviter la formation de reliefs pouvant nuire à l'extraction. L'aorte est ensuite coupée entre les artères collatérales de façon longitudinale en portant une attention particulière lors de l'utilisation des ciseaux pour ne pas toucher l'intérieur. L'aorte est ensuite immobilisée à l'aide d'aiguilles aux quatre coins de celle-ci, sur un plateau de polystyrène recouvert de papier paille préalablement stérilisé, la lumière artérielle vers le haut. L'aorte est ensuite nettoyée à l'aide de PBS stérile pH 7,4 (136,9 mM de NaCl; 2,68 mM de KCl; 10 mM Na₂HPO₄ et 1,76 mM de KH₂PO₄) dans le but de retirer le sang recouvrant l'endothélium. Les BAEC sont ensuite récoltées à l'aide d'un scalpel que l'on incline et effleure avec une faible pression sur l'endothélium de l'aorte. Il est important de ne pas passer la lame du bistouri près des collatérales, action pouvant favoriser la contamination des cellules. De plus, il est important d'éviter de passer deux fois au même endroit pour éviter de récolter des cellules musculaires lisses. Les cellules sont ensuite récoltées sur la lame du bistouri avec un écouvillon que l'on dépose dans un tube Falcon de 15 ml contenant 1 ml de milieu de culture sans sérum. Les cellules sont ensuite dégagées de l'écouvillon en faisant tourner celui-ci sur lui-même. Par après, un volume de 4 ml d'une solution de

collagénase de type 1 à une concentration de 1 mg/ml est ajouté dans le tube afin de séparer les cellules. Le tube contenant les cellules est incubé pour une période de 10 min à 37°C. La réaction de digestion à la collagénase est ensuite arrêtée par l'ajout d'un volume de 6 ml de milieu de culture avec sérum. Les tubes sont ensuite centrifugés 3 min à 1000 RPM pour obtenir un culot de cellules endothéliales. Le surnageant est ensuite aspiré à l'aide d'un système d'aspiration. Les cellules endothéliales sont par la suite resuspendues dans un volume de 4 ml de milieu de culture avec sérum etensemencées dans un pétri de 60 mm. Les cellules endothéliales seront pass  es dans un pétri 100 mm une fois une confluence de 90% atteinte. Une fois ce pétri confluent, les cellules seront pass  es dans plusieurs pétris de 100 mm et pourront alors être utilis  es pour les expérimentations.

2.1.2 Milieu de culture des BAEC

Les CE sont cultiv  es dans un milieu de culture nommé DMEM pour Dulbecco's Modified Eagle Medium (*Life Technologies* cat no. 31600034). Pour faire notre milieu DMEM, le contenu d'une enveloppe de DMEM est ajouté à 500 ml d'eau nanopure puis dissout par agitation. Par après, 3,7 g de bicarbonate de sodium (*Fisher*, cat no. s233-500) et 4,77 g d'HEPES (*Fisher* cat no. bp310-500) sont ajoutés pour tamponner le milieu de culture. Une fois ces deux composés dissouts, la solution de DMEM est compl  t  e à un volume final d'un litre avec de l'eau nanopure. Le pH du milieu est ajusté à 7,1. Le DMEM est ensuite filt   sur des filtres ayant des pores de 22   m de diamètre afin de le stériliser (*Sarstedt* cat no. 83.1823.101). Le pH du milieu de culture monte alors à 7,4 après filtration. Pour la croissance des BAEC, du sérum FBS ou Fetal Bovine Serum (*Wisent* cat no. 080-150) inactivé à la chaleur (1h à 56  C) est ajouté au DMEM à une concentration finale de 5% jusqu'au second passage. Par la suite une concentration de FBS de 2,5 % est utilis  e. De plus, une solution commerciale de P/S ou Pénicilline/Streptomycine (*Wisent* cat no. 450-201-EL)    une concentration finale de 1% est ajout  e au DMEM afin de réduire les risques de contamination par des bactéries. Il est important de mentionner que le milieu de culture utilisé pour cultiver les BAEC contient peu de glucose, soit une concentration de 5,6 mM ou 1 g/L. Nous utilisons cette concentration en glucose, car nous étudions les effets de concentrations élevées de glucose sur les BAEC, il nous faut donc un milieu de culture faible en glucose. De plus, lorsque les BAEC sont exposées en milieu avec des concentrations normales de glucose (NG : 5,6 mM d-glucose) ou élevées de glucose (HG : 25 mM d-glucose), le DMEM ne contient pas de FBS, mais contient du P/S 1%. Lors des traitements en milieu avec des concentrations élevées de glucose, afin de

reproduire une hyperglycémie, nous ajoutons la quantité nécessaire de d-glucose au milieu DMEM P/S 1%. Il est nécessaire d'ajouter 3,5 g/L de d-glucose au DMEM afin d'obtenir une concentration finale de 4,5 g/L ou 25 mM, immédiatement avant de traiter les cellules.

2.1.3 Culture des BAEC

Les BAEC sont cultivées dans des pétris 100 mm avec 7 ml de DMEM FBS 2,5% avec P/S 1%. Elles sont cultivées dans un incubateur à 37°C contenant 5% de CO₂ et 21 % d'O₂. Les cellules sont utilisées à partir du deuxième passage (P2) jusqu'au huitième passage (P8). Les cellules sont passées lorsqu'elles obtiennent une confluence variant de 80 à 90% en effectuant une dilution 1 :10. Le milieu de culture est remplacé tous les 2-3 jours pendant la semaine. En ce qui concerne les passages, le milieu de culture est retiré par aspiration, et du PBS stérile est ajouté pour une durée de 5 minutes. Ce dernier est ensuite aspiré et 1 ml de Trypsine-EDTA 0,05% (*Wisent* cat no. 325-542-CL) est ajouté dans le pétri 100 mm, l'excès est immédiatement retiré par aspiration. Le pétri est ensuite incubé pendant 30 secondes dans l'incubateur à 37 °C afin de faire décoller les cellules. Les cellules sont ensuite resuspendues dans un volume final de DMEM supplémenté en sérum de 10 ml. Un volume de 1 ml de cette suspension de cellules est prélevé et ajouté dans un autre pétri 100 mm contenant 6 ml de DMEM avec sérum pour un volume final de 7 ml (dilution 1:10).

2.1.4 Traitements des BAEC : Voies de signalisation du VEGF en normoxie et hypoxie

Un pétri 100 mm ayant une confluence d'environ 90% est passé puis resuspendu dans un volume total de 10 ml de milieu de culture avec sérum selon la méthode de passage décrite ci-dessus. Ensuite, 1 ml de cette suspension est ajouté par puits d'une plaque 6 puits. Le volume est complété à 1,5 ml avec du milieu de culture avec sérum. Le lendemain, un lavage est effectué avec du milieu de culture sans sérum afin d'enlever toute trace de sérum pouvant modifier les voies de signalisation cellulaires. Les cellules sont ensuite exposées à des concentrations normales de glucose (NG : 5,6 mM) ou élevées de glucose (HG ; 25 mM) pendant 24h (DMEM sans sérum, P/S 1%) avec ou sans hypoxie pour les 16 dernières heures. L'incubateur utilisé pour l'hypoxie est un incubateur à trois gaz (94% d'azote, 5% de CO₂ et 1% d'O₂) afin de reproduire une ischémie sévère, retrouvée chez les patients atteints de maladie des artères périphérique. Les cellules sont ensuite stimulées au VEGF-165 recombinant humain (rh-VEGF-165) (*R&D systems* cat no. 293-

VE-010) à une concentration de 10 ng/ml pendant 10 min (Figure 15). Il est important de mentionner que 8 conditions sont obtenues. Des BAEC exposées en milieu avec des concentrations normales ou élevées de glucose, en normoxie ou hypoxie et sans ou avec stimulation au VEGF.

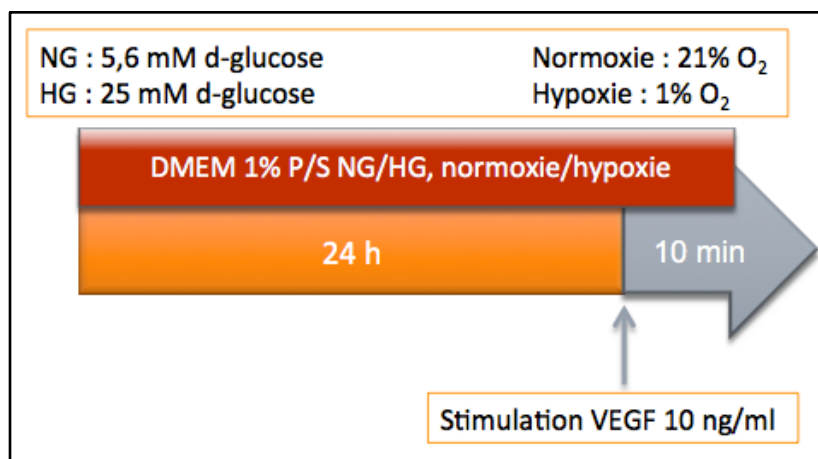


Figure 16 : Traitement des BAEC

Représentation schématique du traitement des cellules endothéliales pour évaluer les voies de signalisation du VEGF en normoxie et en hypoxie. Les BAEC sont exposées à des concentrations normales (NG : 5,6 mM) ou élevées (HG : 25 mM) de glucose pendant 24h en présence ou absence d'hypoxie pour les 16 dernières heures. Les BAEC sont ensuite stimulées au VEGF 10 ng/ml pendant 10 min.

2.1.5 Extraction des BAEC

Une fois les traitements terminés, le milieu de culture est retiré par aspiration et du PBS froid pH 7,4 (4°C) est ajouté sur les cellules afin d'effectuer un lavage pour arrêter la signalisation cellulaire. Les BAEC sont ensuite lysées sur glace par l'ajout de 150 µl de tampon de RIPA (*Radioimmunoprecipitation*) froid par puits (voir tableau 2). Les cellules sont ensuite laissées sur glace 20 minutes afin de s'assurer que la lyse cellulaire est complète. Les puits sont ensuite grattés avec un grattoir à cellules puis le lysat cellulaire est ensuite transféré dans un tube *Eppendorf* de 1,5 ml. Les tubes sont ensuite centrifugés à 13 200 RPM pendant 10 min, à 4°C. Le surnageant est ensuite transféré dans un autre tube 1,5 ml puis congelé à -80°C jusqu'à utilisation pour immunobuvardage de type Western pour évaluer l'expression de protéines.

Tableau 2 : Composition du tampon RIPA

Ingrédients	Concentration initiale	Concentration finale	Volume pour 1 ml (ul)	volume pour 1 tube 10 ml (ml)	Volume pour 30 tubes (ml)
dH ₂ O			716	7.16	214.8
Tris-HCl; pH 7.4 (à partir du Tris base)	1 M	50 mM	50	0.5	15
NaCl	5 M	150 mM	30	0.3	9
EDTA; pH 7.4	0.5 M	2 mM	4	0.04	1.2
Sodium désoxycholate	10%	0.50%	50	0.5	15
SDS	10%	0.1%	10	0.1	3
Triton	10%	1.0%	100	1	30
À ajouter au tampon lors du dégel					
PMSF	0.1 M	1 mM	10	100	
Aprotinine	5.1 mg prot./ml	0.0255 mg prot./ml	5	50	
Leupeptine	1 mg/ml	0.01 mg/ml	10	100	
À ajouter avant l'extraction					
NaF	200 mM	1 mM	5	50	
Na ₃ VO ₄	0.1 M	1 mM	10	100	
Volume total			1ml	10ml	

2.2 Analyse de l'expression protéique et immunobuvardage de type Western

Les échantillons de protéines extraits (conservés à -80°C) sont décongelés sur glace. Ceux-ci sont ensuite dosés à l'aide du kit *DC protein assay* (Biorad cat no. 500-0113, 0114, 0115). Un volume correspondant à une concentration de protéine d'environ 30 à 50 µg est déposé dans un tube 1,5 ml contenant 10 µl de tampon Laemmli 2X (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8 ; 10% glycérol ; 2% SDS ; 300 mM 2-β-mercaptoéthanol et 0,1% bleu de bromophénol) et ce pour chaque échantillon. Les échantillons sont ensuite chauffés pendant 5 min dans un bloc chauffant à 95 °C.

Ceux-ci sont ensuite centrifugés afin que toute la vapeur d'eau qui s'est déposée sur les parois et sur le couvercle du tube puisse descendre au fond du tube pour avoir la bonne concentration de protéine. Un marqueur de poids moléculaire de Biorad (*Precision Plus Protein™ Dual Color Standards*, cat no. 1610374) est déposé dans le premier puits de chaque gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE) afin de pouvoir suivre la migration des protéines et de situer le poids moléculaire de notre protéine d'intérêt. Les échantillons sont ensuite déposés sur gel de polyacrylamide. Les concentrations des gels utilisés étaient de 7,5% pour séparer les protéines de haut poids moléculaires et de 10% pour séparer les protéines de plus petits poids moléculaire (voir tableau 3). Les échantillons sont ensuite migrés à 110 volts pour 10 min afin de permettre l'entrée des protéines dans le gel séparateur puis à 200 volts pour 60 min pour permettre une bonne séparation des protéines d'intérêt. Il faut noter que parfois il est nécessaire de migrer un peu plus que 60 min si la protéine d'intérêt est un récepteur de haut poids moléculaire. La migration des protéines sur gel s'effectue dans un kit d'électrophorèse de Biorad (*Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell*) avec tampon d'électrophorèse (25 mM Tris base ; 0,1 % SDS ; 192 mM glycine ; ddH₂O).

Tableau 3: Composition des gels de polyacrylamide

	Gel concentrateur 4%	Gel séparateur 7,5%	Gel séparateur 10%
ddH ₂ O	5,8 ml	10,9 ml	9,7 ml
Bis/acrylamide 40% (Biorad)	1 ml	3,8 ml	5 ml
1,5M Tris-HCL pH 8,8		5 ml	5 ml
1,0M Tris-HCL pH 6,8	1 ml		
SDS 10%	80 µl	200 µl	200 µl
APS 10%	80 µl	100 µl	100 µl
TEMED (VWR cat no. CA8930)	8 µl	10 µl	10 µl

Environ 10 min avant la fin de la migration, les membranes PVDF (Pre-Wet Immobilon-P, *Millipore* cat no. IPVH00010) sont pré-hydratées en les trempant dans du méthanol 100% pendant 5 sec. Les membranes sont ensuite rincées avec de l'eau nanopure et mises sous agitation dans de l'eau nanopure pendant 5 min. Une fois la migration terminée, les gels sont démoulés et déposés dans du tampon de transfert (25 mM Tris-base; 192 mM glycine; 20% méthanol; ddH₂O) pour 15

min. Au même moment, l'eau dans laquelle les membranes PVDF baignent est retirée et du tampon de transfert est ajouté et les membranes sont mises sous agitation pendant 15 min. Ensuite, le transfert des protéines sur membrane de PVDF est effectué à l'aide du module de Biorad dans l'ordre suivant : éponge-papier whatman-gel de polyacrylamide-membrane PVDF-papier whatman-éponge. Le transfert est ensuite effectué à 4 °C, dans du tampon de transfert froid pour une durée de 30 min à 100 volts ou à 90 mA pour une durée de 16h pour les protéines ayant un poids moléculaire supérieur à 100 kDa. Les membranes sont ensuite déposées dans une solution de Ponceau S pour 1 min afin de colorer les protéines en rouge. Ceci est particulièrement utile afin de voir si le transfert s'est bien passé et si chaque puits contient la même quantité de protéines. Il est par ailleurs avantageux de colorer au Ponceau S, puisque la membrane peut être aisément coupée en deux et il devient alors possible d'incuber les deux portions membrane dans deux anticorps différents pour vérifier l'expression de deux protéines distinctes. Les membranes sont ensuite rincées au PBS-T (PBS; Tween 0,1%) pour enlever le rouge de Ponceau et déposées dans une solution de blocage (PBS-Tween 0,1% et lait 5%) pendant 1h à TP dans le but de bloquer les sites non-spécifiques. Après le blocage, les membranes sont incubées dans une solution d'anticorps à une dilution 1:1000 (voir tableau 4) pendant toute la nuit à 4°C sous agitation. Pour ce faire, 5 µl de l'anticorps désiré est placé dans 5 ml de la solution de blocage (PBS-T avec lait 5% ou PBS-T avec BSA 5%) dans un tube Falcon de 50 ml. Le lendemain, les membranes sont lavées 3 x 5 min dans la solution de PBS-T afin de s'assurer que l'anticorps primaire non-lié sur la membrane est enlevé. Ensuite, la membrane est incubée dans une solution d'anticorps secondaire à une dilution 1:2000, 1:5000 ou 1:10 000 (voir tableau 4) 1h à TP. Une fois l'incubation des membranes dans l'anticorps secondaire terminée, les membranes sont rincées 3 x 5 min dans du PBS-T. Il est important de choisir le bon anticorps secondaire, c'est-à-dire que l'anticorps primaire et secondaire doivent provenir de la même espèce pour qu'il y ait liaison. De plus, l'anticorps secondaire est couplé à la peroxydase de raifort (HRP) lui permettant alors de provoquer une réaction de chimiluminescence que l'on peut détecter en présence de son substrat. Une solution de révélation est ensuite ajoutée sur les membranes, généralement un volume de 300 µl par membrane. Pour les protéines plus exprimées, générant alors une intensité de signal plus forte, le ECL (*ThermoFisher Scientific* cat no. PI32106) est utilisé. Pour les protéines moins exprimées, générant alors une intensité de signal plus faible, le Luminata Forte est utilisé (*Millipore* cat no. WBLUF0100). Les membranes sont ensuite révélées avec le *ChemiDoc MP Imaging System* de *Biorad*. Un dosage

densitométrique des bandes est ensuite effectué avec le logiciel *Image Lab 5.2* de *Biorad*. Les données densitométriques pour les protéines phosphorylées ont été rapportées sur les valeurs densitométriques de leurs protéines totales correspondantes. Pour les autres protéines, les valeurs ont été rapportées sur les valeurs de la β -actine, un gène stable. Ces rapports obtenus sont ensuite rapportés sur la valeur de la condition contrôle, soit NG normoxie afin d'obtenir un rapport d'augmentation.

Tableau 4 : Liste des anticorps utilisés

Nom de l'anticorps	Solution d'incubation utilisée	Dilution	Solution de révélation	Fournisseur	Cat #
p-Akt	PBS-T, Lait 5%	1:1000	Luminata	<i>Cell signaling</i>	4058
p-Erk	PBS-T, Lait 5%	1:1000	ECL	<i>Cell signaling</i>	4370
p-VEGFR2	PBS-T, BSA 5%	1:1000	Luminata	<i>Cell signaling</i>	2478
SHP-1	PBS-T, Lait 5%	1:1000	ECL	<i>Santa-Cruz</i>	Sc-287
SHP-2	PBS-T, Lait 5%	1:1000	ECL	<i>BD Biosciences</i>	610621
PTP1B	PBS-T, Lait 5%	1:1000	ECL	<i>BD Biosciences</i>	610139
t-Akt	PBS-T, Lait 5%	1:1000	ECL	<i>Cell signaling</i>	9272
t-ERK	PBS-T, Lait 5%	1:1000	ECL	<i>Cell signaling</i>	4695
VEGFR2	PBS-T, Lait 5%	1:1000	ECL	<i>Cell signaling</i>	2479
Actine-HRP	PBS-T, Lait 5%	1:7000	ECL	<i>Santa Cruz</i>	Sc-1616
Anti-Rabbit HRP	PBS-T, Lait 5%	p-Akt : 1:5000	Luminata (p-Akt et p-VEGFR-2) et ECL	<i>Cell signaling</i>	7074
		pVEGFR2 : 1:2000			
		Autres : 1:10 000			
Anti-mouse HRP	PBS-T, Lait 5%	1:10 000	ECL	<i>Cell signaling</i>	7076

De surcroît, il a été nécessaire d'incuber plusieurs anticorps sur la même membrane. Il a donc été nécessaire de «stripper» nos membranes, c'est-à-dire de retirer le complexe anticorps primaire-anticorps secondaire de la membrane. Pour ce faire, les membranes ont été incubées dans une solution de «stripping» (*ThermoFisher Scientific* cat no. PI46430) pendant 15 min à TP sous agitation. Les membranes ont ensuite été lavées au PBST 3x10 min. Par après, les membranes ont été bloquées de nouveau dans la solution de blocage et incubées dans la solution d'anticorps désirée, tel que décrit précédemment.

2.3 Co-immunoprécipitation

Pour les expérimentations de co-immunoprécipitations, 4 pétris 100 mm confluents (90% de confluence) de BAEC sont resuspendus dans 10 ml de DMEM FBS 2,5%. Ces pétris sont alors passés pour faire deux pétris par 100 mm (dilution 1:2), ce qui donne au total 8 pétris 100 mm. On se retrouve alors avec 2 pétris par condition. Le lendemain, les BAEC sont exposées en milieu avec des concentrations normales ou élevées de glucose pour une période de 24h avec les dernières 16h en présence ou absence d'hypoxie (voir figure 15). On a alors 2 pétris NG normoxie, 2 pétris HG normoxie, 2 pétris NG hypoxie et 2 pétris HG hypoxie. Une fois le 24h terminé, le milieu des BAEC est retiré et du PBS froid est ajouté aux pétris. Les BAEC sont ensuite lysés dans 200 µl de tampon IP (voir tableau 2) sur glace. Le lysat cellulaire des deux pétris de BAEC qui a été exposé aux mêmes conditions est ensuite combiné afin d'avoir une concentration de protéines plus grande. Les protéines sont ensuite extraites en effectuant une centrifugation à 13 200 RPM pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant, contenant les protéines cytoplasmiques, est dosé à l'aide des réactifs du kit *DC protein assay* de *Biorad*. Un volume correspondant à 1000 µg de protéines est prélevé, ce dernier étant ensuite complété à 500 µl avec du tampon d'IP. Le tampon IP diffère du tampon RIPA dans le sens où il ne contient pas de SDS ni de sodium désoxycholate afin de préserver les complexes protéines-protéines. Ensuite, 1 µg d'anticorps anti-SHP-1 (*Santa Cruz* cat no. sc-287) correspondant à un volume de 5 µl est ajouté dans chaque tube et les tubes sont incubés à 4°C pendant 90 min avec agitation par rotation. Suite à cette incubation, 35 µl de billes A/G (*Santa Cruz* cat no. sc-2003) préalablement lavées 3 fois avec du tampon IP sont ajoutés par tube. Les tubes sont ensuite incubés avec les billes pendant 30 min sous rotation à 4°C. Une fois l'incubation terminée, les tubes sont centrifugés 30 sec à 1000 RPM et le surnageant est ensuite retiré, laissant

les billes au fond du tube. Les billes sont lavées par l'ajout de 500 µl de tampon IP et les tubes sont recentrifugés. Cette étape de lavage est répétée 3 fois. Après le 3^e lavage, les tubes sont recentrifugés et le surnageant est retiré puis les billes sont resuspendues dans 25 µl de tampon Laemmli 2X. Les échantillons sont ensuite chauffés 5 min à 70°C et déposés sur gel SDS-PAGE 7,5% pour migration.

2.4 Essai phosphatase

L'essai phosphatase débute par une co-immunoprécipitation de SHP-1 effectuée de façon identique à la section précédente jusqu'au dernier lavage des billes. Cependant, le tampon de lyse utilisé est le tampon IP excluant le NaF, le Na₃VO₄ et le PMSF qui sont des inhibiteurs de phosphatases. De plus, un blanc constitué de 500 µl de tampon de lyse (sans protéine) suivra toutes les mêmes étapes que les autres tubes, de l'ajout des billes jusqu'à la fin de l'essai phosphatase. Au dernier lavage, le surnageant est retiré et les billes sont resuspendues dans 125 µl de tampon. Ensuite, les tubes sont chauffés à 70°C pendant 5 min. Les tubes sont par après centrifugés 30 sec à 1000 RPM afin de former un culot de billes et le surnageant est transféré dans un autre tube qui sera incubé sur glace pendant 15 min. L'activité phosphatase de SHP-1 a été évaluée à l'aide d'un kit de *Promega* (cat no. V2471). Ainsi, 12,5 µl des phosphopeptides 1 et 2 ont été ajoutés dans les échantillons incluant le blanc. Les tubes ont été incubés à 37°C sous rotation continue pendant 1h. La réaction est terminée par l'ajout de 150 µl d'une solution de molybdate obtenue en ajoutant 10 µl d'un mélange de molybdate additif à 1ml d'une solution de colorant de molybdate. Les tubes sont incubés sous rotation continue à TP pour une durée de 15 min. La coloration verte obtenue reste stable pour une durée de 2h. Dans une plaque 96 puits à fonds ronds, 100 µl de chaque échantillon est déposé en duplicata puis la plaque est mise pour lecture de l'absorbance à 630 nm dans un lecteur de plaque (*Infinite 200 PRO de TECAN*).

2.5 Prolifération cellulaire

Les BAEC d'un pétri 100 mm confluent (~90%) sont resuspendues dans 10 ml de DMEM 2,5% FBS. Les cellules sont ensuite comptées à l'hématimètre puis une dilution de 25 000 cellules/ml est réalisée. Un volume de 200 µl estensemencé par puits d'une plaque 96 puits à fond plat (*Falcon* cat no. 353072) afin d'avoir 5 000 cellules par puits. Des triplicatas ont été faits pour chaque condition. Le milieu de culture a été retiré des puits à l'aide d'une micropipette 4h suivant

l'ensemencement et tous les puits ont été lavés avec 200 μ l de DMEM sans sérum. Un volume de 200 μ l de DMEM sans sérum à 5,6 mM ou 25 mM de glucose est ajouté par puits. Après une incubation de 24h, les cellules sont stimulées au VEGF 25 ng/ml (*R&D systems* cat no. 293-VE-010) en normoxie ou en hypoxie pour les 24 prochaines heures. On se retrouve donc à avoir 8 conditions: NG, NG+VEGF, HG, HG+VEGF normoxie et hypoxie. Le milieu est ensuite retiré des puits à l'aide d'une micropipette et les puits sont lavés avec 50 μ l de PBS pH 7,4. Les BAEC sont ensuite fixées avec une solution de Formaline (*VWR* cat no. 89370-094) pendant 5 min. Les puits sont lavés 2 x 5 min au PBS. Les BAEC fixées sont incubées avec 50 μ l d'une dilution 1:5000 de DAPI 5 mg/ml dans du PBS pH 7,4 (*Sigma-Aldrich* cat no. D9542) pendant 10 min. Les puits sont lavés 2 x 5 min avec 50 μ l de PBS. Le PBS est retiré et 100 μ l de PBS est ajouté par puits. La prolifération cellulaire est ensuite quantifiée en comptant au microscope à fluorescence (*Nikon Ti Eclipse*), avec le logiciel *NIS-Elements AR 4.30.02*, 4 champs représentatifs par puits. Le nombre de cellules par mm^2 par puits est ensuite obtenu en faisant la moyenne du nombre de cellules pour les 4 champs comptées par puits et en divisant ce nombre par l'aire totale d'un puits, soit 2,336 mm^2 .

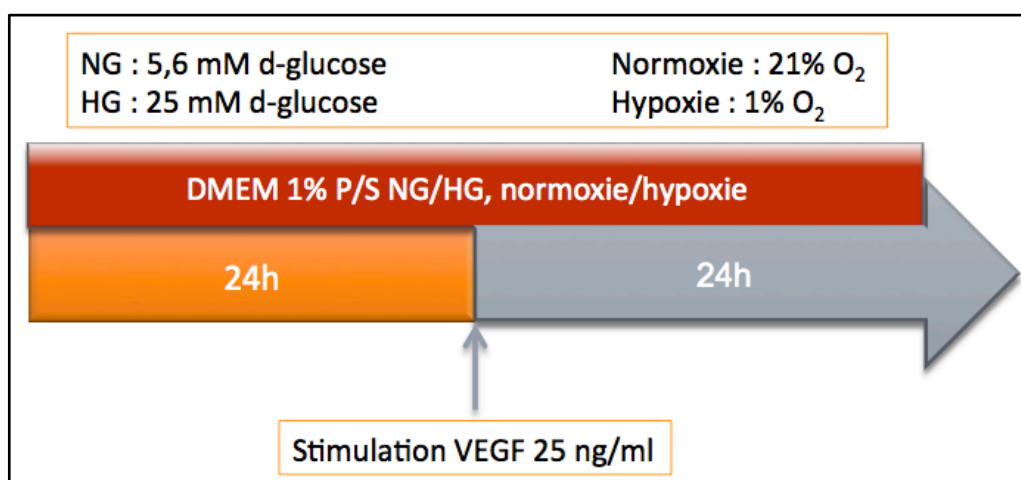


Figure 17 : Traitement des BAEC pour la prolifération cellulaire

Représentation schématique du traitement des cellules endothéliales pour évaluer les effets du VEGF sur la prolifération cellulaire en normoxie et en hypoxie. Les BAEC sont exposées à des concentrations normales (NG : 5,6 mM) ou élevées (HG : 25 mM) de glucose pendant 48h. Les BAEC sont stimulées au VEGF 25 ng/ml en présence ou absence d'hypoxie pour les dernières 24h. Les cellules sont ensuite fixées puis colorée au DAPI et comptées.

2.6 Migration cellulaire

Les BAEC d'un pétri 100 mm confluent (~90%) sont resuspendues dans 10 ml de DMEM 2,5%

FBS. Les cellules sont ensuite comptées à l'hématimètre puis une dilution de 250 000 cellules/ml est préparée. Afin d'obtenir un espace constant de 500 μm exempt de cellules nous permettant de quantifier la migration cellulaire, des inserts de la compagnie *Ibidi* sont utilisés (cat no. 80209). Les inserts sont apposés au fond d'une plaque 12 puits de façon étanche. Un volume de 100 μl de la suspension cellulaire, correspondant à 25 000 cellules, est ajouté dans chacune des chambres. Une fois que les cellules sont adhérentes, soit 4h suivant l'ensemencement, le milieu est retiré puis les chambres sont lavées avec 100 μl de DMEM sans sérum. Le milieu est délicatement retiré en prenant soin de ne pas endommager le tapis cellulaire formé au fond des 2 chambres constituant l'insert. Un volume de 100 μl de DMEM sans sérum à 5,6 mM ou 25 mM de glucose est ajouté par chambre pour une durée de 24h. Après ce sevrage, le milieu et les inserts sont retirés délicatement laissant l'espace de 500 μm exempt de cellules entre les deux tapis cellulaires. Un volume de 1 ml de milieu sans sérum à 5,6 mM ou 25 mM de glucose est ajouté dans chacun des puits. Les cellules sont ensuite stimulées au VEGF 25 ng/ml. Des photos sont prises au temps 0h, soit après le retrait de l'insert et la stimulation au VEGF. Les cellules sont mises en présence ou absence d'hypoxie pour les 16 dernières heures. Des photos sont prises au temps 16h. La surface (aire en %) exempte de cellules est quantifiée à l'aide des logiciels *Photoshop CS6* et *Image J* aux temps 0h et 16. Le pourcentage de surface libre est ensuite déterminé en faisant le rapport des valeurs obtenues aux temps 16h sur les valeurs obtenues aux temps 0h. Le pourcentage de surface occupé ou de migration est ensuite déterminé en effectuant l'équation suivante: $100 - \% \text{ de surface libre}$. Enfin, cette expérimentation compte aussi 8 conditions: NG, NG+VEGF, HG, HG+VEGF normoxie et hypoxie.

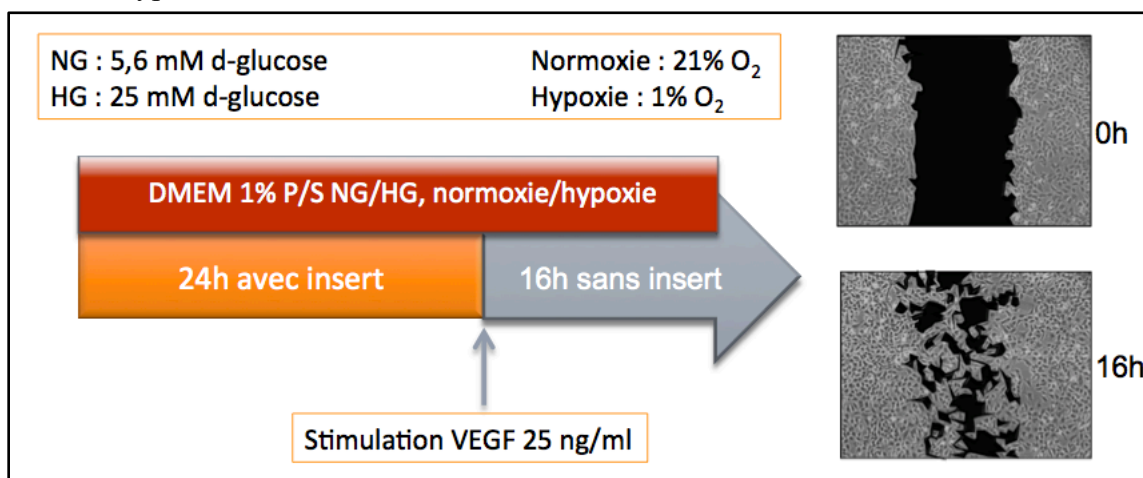


Figure 18 : Traitement des BAEC pour la migration cellulaire

Représentation schématique du traitement des cellules endothéliales pour évaluer les effets du

VEGF sur la migration cellulaire en normoxie et en hypoxie. Les BAEC sont exposées à des concentrations normales (NG : 5,6 mM) ou élevées (HG : 25 mM) de glucose pendant 24h. Les inserts sont ensuite retirés et les BAEC sont stimulées au VEGF 25 ng/ml en présence ou absence d'hypoxie pour les 16 dernières heures avec des concentrations normales ou élevées de glucose. Des photos sont prises au temps 0h, soit immédiatement après le retrait de l'insert et avant la stimulation au VEGF, puis à la fin de l'expérimentation. La surface non-occupée par les cellules est quantifiée, représentée par la coloration noire sur les images.

2.7 Essai d'angiogenèse sur matrigel

Pour les essais d'angiogenèse, les BAEC d'un pétris confluent (~90%) sont resuspendues dans 10 ml de DMEM avec sérum. Les cellules sont passées pour faire 2 pétris 100 mm (dilution 1:2). Le lendemain, soit lorsque les cellules ont atteint une confluence d'environ 80%, un lavage avec 4 ml de DMEM sans sérum est fait pour retirer toute trace de sérum. Le milieu est retiré et 7 ml de DMEM sans sérum à 5,6 mM ou 25 mM de glucose est ajouté par pétri pour une durée de 24h. Pour étudier l'angiogenèse, les μ -Slides de la compagnie *Ibidi* (cat no. 81506) ont été utilisées. Avant d'ensemencer les cellules dans la μ -Slide, celle-ci a été déposée sur glace pour atteindre une température de 4°C. Du matrigel réduit en facteurs de croissances (*Corning* cat no. 356230) est dégelé sur glace puis ajouté à raison de 10 μ l par puits avec des «tips» entreposés à -80°C avant utilisation. Le matrigel est gelé à -20°C, liquide à 4°C et solide à 37°C. La μ -Slide est alors mise dans l'incubateur à 37°C pendant 30 min afin que le matrigel se solidifie. Les pétris sont ensuite resuspendus dans 10 ml de DMEM FBS 1,0% et la suspension cellulaire est transférée dans un tube *Falcon* de 50 ml. Les tubes sont ensuite centrifugés pendant 2 min à 1000 RPM, à TP. Le milieu est retiré délicatement par aspiration. Les culots de BAEC sont resuspendus dans 3 ml de DMEM sans sérum à 5,6 mM ou 25 mM de glucose. Les cellules sont comptées à l'hématimètre puis un volume de DMEM NG ou HG, déterminé par les concentrations de cellules, est ajouté aux tubes *Falcon* afin d'obtenir une dilution de 600 000 cellules/ml. Un volume de 50 μ l, représentant 30 000 cellules, est ajouté par puits de la μ -Slide. Les cellules sont par la suite stimulées au VEGF 25 ng/ml. La μ -Slide est ensuite installée sur le microscope *Nikon Ti Eclipse* dans une chambre à 37°C, à 5% CO₂ en normoxie ou hypoxie de la compagnie *Ibidi*. Des photos d'un champ représentatif par puits sont prises aux temps 0h et 4h. La formation de tubules est quantifiée avec le logiciel *Image J* en comptant le nombre de tubules formés par les connexions entre les cellules. Enfin, cette expérimentation compte aussi 4 conditions en normoxie et en hypoxie soit NG, NG+VEGF, HG et HG+VEGF.

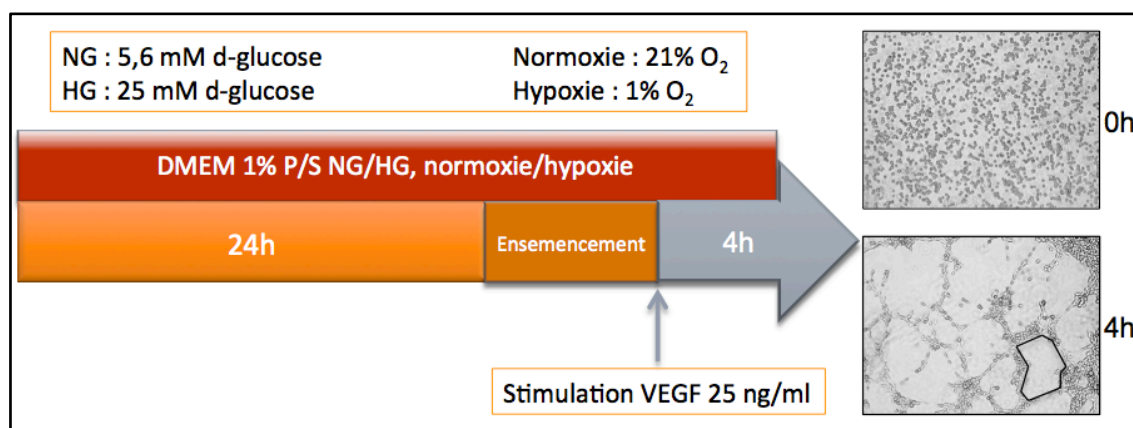


Figure 19 : Traitement des BAEC pour les essais d'angiogénèse

Représentation schématique du traitement des cellules endothéliales pour évaluer les effets du VEGF sur la formation de tubules en normoxie et en hypoxie. Les BAEC sont exposées à des concentrations normales (NG : 5,6 mM) ou élevées (HG : 25 mM) de glucose 24h avant d'être ensemencées sur le matrigel et 4h suivant l'ensemencement. Les BAEC sont immédiatement stimulées au VEGF 25 ng/ml en présence ou absence d'hypoxie et des photos sont prises aux temps 0h et 4h. Le nombre de tubules par champ est ensuite quantifié, tel que montré par les traits noirs sur la photo au temps 4h.

2.8 Infections Adénovirales

Afin de valider le rôle de SHP-1 dans les voies pro-angiogéniques du VEGF, une forme dominante négative de SHP-1 (Ad-SHP-1 DN) a été surexprimée dans les BAEC à raison de 100 MOI pour *multiplicity of infection* (voir tableau 4). Ce vecteur adénoviral est généré par la substitution d'une cystéine en sérine (C453S) dans le site actif de SHP-1, ce qui a pour effet d'abolir complètement son activité catalytique (Dustin et al., 1999). L'adénovirus GFP (Ad-GFP) a été utilisé comme contrôle. Les BAEC ont été infectées avec l'adénovirus GFP à raison de 100 MOI également.

Tableau 5 : Concentrations et volumes d'adénovirus utilisés

Adénovirus	Concentration	Volume pour 5 x 10 ⁵ cellules	Volume pour 1 x 10 ⁶ cellules
GFP	2,5 x 10 ¹⁰	2 µl	4 µl
SHP-1 DN	1,0639 x 10 ¹¹	0,47 µl	0,94 µl

2.8.1 Signalisation cellulaire

Un pétri de BAEC 100 mm confluent est resuspendu dans 10 ml de DMEM avec sérum et les cellules sont comptées à l'hématimètre. Deux pétris 100 mm sont ensuite ensemencés avec un

volume de suspension cellulaire correspondant à 1 000 000 de cellules. Il est nécessaire de faire deux pétris par expérimentation puisqu'un pétri est infecté avec l'adénovirus GFP et l'autre avec l'adénovirus SHP-1 DN. Le lendemain, les cellules sont infectées avec les adénovirus à raison de 100 MOI. Pour ce faire, le milieu des pétris est retiré puis un volume de 4 ml de DMEM sans sérum contenant l'adénovirus est ajouté dans le pétri 100 mm. L'infection est ensuite amorcée par l'incubation des pétris à 37 °C avec agitation pendant 2h. Après cette incubation, 4 ml de DMEM avec une concentration de sérum de 5% sont ajoutés par pétri pour avoir une concentration finale de 2,5%. Après une incubation de 24h, les pétris sont resuspendus dans 10 ml de DMEM avec sérum puis un volume de 1,5 ml est ajouté dans chacun des puits d'une plaque 6 puits. La signalisation cellulaire est évaluée tel que décrit à la section 2.1.4. Il est important de préciser que les expérimentations ont été effectuées en normoxie seulement pour la signalisation cellulaire par manque de temps. Ainsi, 8 conditions ont été obtenues : GFP NG, GFP NG+VEGF, GFP HG, GFP HG+VEGF, SHP-1 DN NG, SHP-1 DN NG+VEGF, SHP-1 DN HG et SHP-1 DN HG+VEGF.

2.8.2 Prolifération et migration cellulaire

Les BAEC d'un pétri 100 mm confluent sont resuspendues dans 10 ml de DMEM avec sérum et les cellules sont comptées à l'hématimètre. Un volume correspondant à 500 000 cellules est ajouté par pétri 60 mm. Il est nécessaire de faire 4 pétris 60 mm, 2 qui seront infectés avec l'adénovirus GFP et 2 infectés avec l'adénovirus SHP-1 DN pour les deux types d'expérimentation. Le lendemain, le milieu est retiré et les cellules sont infectées à 100 MOI dans un volume final de 1 ml de DMEM sans sérum (voir tableau 5). Après une incubation de 2h à 37°C avec agitation, 1 ml de DMEM sans sérum est ajouté dans chacun des pétris ainsi que 2 ml de DMEM FBS 5% (concentration finale 2,5%). Après une incubation de 48h, les pétris sont resuspendus dans 3 ml de DMEM avec sérum puis comptées à l'hématimètre. Les expériences sont par la suite effectuées telles que décrites à la section 2.5 pour la prolifération cellulaire et à la section 2.6 pour la migration cellulaire. On se retrouve avec 16 conditions pour la prolifération cellulaire et 16 conditions pour la migration cellulaire (voir tableau 6).

Tableau 6 : Conditions expérimentales pour la prolifération et migration cellulaire avec infection adénovirale

Normoxie	GFP NG	GFP NG+VEGF	GFP HG	GFP HG+VEGF
	SHP-1 DN NG	SHP-1 DN NG+VEGF	SHP-1 DN HG	SHP-1 DN HG+VEGF
Hypoxie	GFP LG	GFP LG+VEGF	GFP HG	GFP HG+VEGF
	SHP-1 DN LG	SHP-1 DN LG+VEGF	SHP-1 DN HG	SHP-1 DN HG+VEGF

2.8.3 Essai d'angiogenèse sur matrigel

Deux pétris 100 mm confluent de BAEC sont resuspendus dans 10 ml de DMEM avec sérum puis combinés dans un tube *Falcon* de 50 ml. Les cellules sont comptées à l'hématimètre puis 4 pétris 100 mm sontensemencés à raison de 1 000 000 de cellules par pétri. Le lendemain, le milieu est retiré et les cellules sont infectées à 100 MOI dans un volume final de 4 ml de DMEM sans sérum. Deux pétris sont infectés avec l'adénovirus GFP et deux pétris sont infectés avec l'adénovirus SHP-1 DN pendant 2h sous agitation à 37°C. Une fois l'incubation terminée, 4 ml de DMEM avec FBS 5% sont ajoutés par pétri. Le lendemain, 24h suivant l'infection, le milieu est aspiré puis un pétri infecté GFP est exposé en milieu NG et l'autre pétri infecté GFP est exposé en milieu HG pour une période de 24h. La même procédure est effectuée pour les pétris infectés SHP-1 DN. Une fois le sevrage terminé, les cellules sont resuspendues puis comptées et l'expérience d'angiogenèse est effectuée telle que décrite à la section 2.7. Il y a également 16 conditions (voir tableau 6).

2.9 Analyse de l'expression génique

2.9.1 Extraction de l'ARNm

Des BAEC sontensemencées et traitées tel que décrit à la section 2.1.4, cependant sans stimulation au VEGF. Les cellules sont lysées dans 1 ml de *Tri Reagent* (*Molecular Research Center* cat no. TR118-500). Un volume de 200 µl de chloroforme est ajouté à chacun des échantillons. Les tubes sont brassés de façon vigoureuse pendant 15 sec puis incubées à TP pendant 15 min. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 12 000 g pendant 15 min à 4°C afin d'obtenir trois phases distinctes. La phase aqueuse transparente qui est située au-dessus contient l'ARNm. Cette dernière est transférée dans un nouveau tube de façon délicate afin de ne pas toucher l'interphase qui contient des protéines, action qui contaminerait l'ARNm. Afin de précipiter l'ARNm, un volume

de 500 µl d'isopropanol est ajouté à chacun des tubes et ils sont incubés à TP pendant 10 min. Les tubes sont par la suite centrifugés à 12 000 g pendant 8 min à 4°C pour faire culoter l'ARN. Le surnageant est ensuite retiré et le culot d'ARNm est lavé avec 1 ml d'éthanol 75% *RNase free* froid. Les tubes sont ensuite vortexés puis centrifugés à 7 500 g 5 min à 4°C. Le surnageant d'éthanol est ensuite retiré et les culots d'ARNm sont séchés 5 min puis dissouts dans 20 µl d'eau *RNase free* (Qiagen cat no. 129112) et les tube sont placés sur glace sèche. L'ARNm est ensuite conservée à -80°C.

2.9.2 Transcription de l'ADNc

L'ARNm extrait est dosé avec l'appareil *NanoDrop 2000* (ThermoFisher Scientific). Un volume correspondant à 1 µg d'ARNm est mis dans un autre tube. Ensuite, 1 µl d'oligo(dt) random primer (500 µg/ml, *Invitrogen*) et 1 µl d'un mélange de nucléotides 10 mM (dNTP, *Invitrogen*) sont ajoutés dans le tube. Le volume est complété à 12 µl avec de l'eau *RNase free*. Les tubes sont chauffés à 65 °C pendant 5 min afin de dénaturer l'ARNm, à l'aide de l'appareil *C1000 Thermal Cycler* de *Biorad*. Par après, on ajoute à chacun des tube un mélange composé de 4 µl de 5X First Strand Buffer, 2 µl de DTT 0.1M, 1 µl de RNase Out et 1 µl de M-MLV RT (200 U/µl), des produits provenant de la compagnie *Invitrogen* à l'exception de la M-MLV RT provenant de la compagnie *ThermoFisher Scientific* (cat no. 28025013). Le protocole permettant de faire la transcription inverse est ensuite effectué à l'aide de l'appareil *C1000 Thermal Cycler* de *BioRad* : 50 min à 37°C suivi de 15 min à 70°C. Une fois la réaction terminée, 80 µl d'eau sont ajoutés dans chacun des tubes afin de diluer l'ADNc obtenue par la réaction. Les tubes contenant l'ADNc sont ensuite conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

2.9.3 PCR quantitative (qPCR)

La technique de SYBR Green a été utilisée pour les expériences de PCR quantitative. En effet, le SYBR Green a la particularité d'émettre une fluorescence une fois liée à l'ADN qui est représentative de la quantité d'ARN présente dans chacun des échantillons. Le SYBR Green est fait dans notre laboratoire en adaptant une recette que l'on retrouve sur le site de *DNA Polymerase Technology* (voir tableau 7). La préparation des échantillons s'effectue en utilisant 1 ng/µl d'ADNc, 500 nM de chaque amorce (voir tableau 8) et du SYBR Green 1X (voir tableau 9). Les échantillons sont ensuite déposés en duplicata sur une plaque 96 puits de *Sarstedt*. La plaque est

ensuite mise dans l'appareil *Realplex Mastercycler* de *Eppendorf* selon le programme suivant : 40 cycles de 15 sec à 94°C, 15 sec à 60°C et 20 sec à 72°C. Ce programme représente les étapes de séparation des brins d'ADN, d'hybridation des amorces et d'élongation, respectivement (voir figure 19).

Tableau 7 : Préparation du MasterMix SYBR Green 2X

	Compagnie	Cat#	1500 réactions
Klentaq Buffer 10X	DNA Polymerase Technology	rb10	3 ml
dNTPs (10 mM)	Invitrogen	18427-088	600 µl
Omni KlenTaq	DNA Polymerase Technology	340	120 µl
Sybr Green 10X	Invitrogen	S-7563	3 ml
RNase/DNase free H ₂ O	Wisent	809-115-CL	8,28 ml
Total			15 ml

Tableau 8 : Séquences des amorces bovines utilisées pour les expériences de qPCR

Gène	Foward	Reverse
bSHP-1	AGCGCTCGGGCATGGT	CGATGGCCACGTAGATGAACT
bSHP-2	GGAGAGAAATTTGCCACTTTGG	TAGTTGCCCCGTGATGTTCCA
bPTP1B	CATGCAGAGTGGCCAAGCT	GGGACTGACGTCTCTGTACCTGTT
bVE-PTP	GGTAGGACTGGAACCTTTATTGCA	TCCATAAATGTCCACAGAATCTTTG
b18S	CGGCTACCACATCCAAGGAA	AGCCGCGGTAATTCCAGC

Tableau 9 : Composition d'une réaction de qPCR

	Pour 1 tube de 50 µl	[Finale]
2X Master Mix Sybr Green	25 µl	1x
Gene F primer 100 uM	0,25 µl	500 nM
Gene R primer 100 uM	0,25 µl	500 nM
DEPC water	19,50 µl	
RT product (10 ng/ul)	5 µl	1 ng/µl
Total	50 µl	

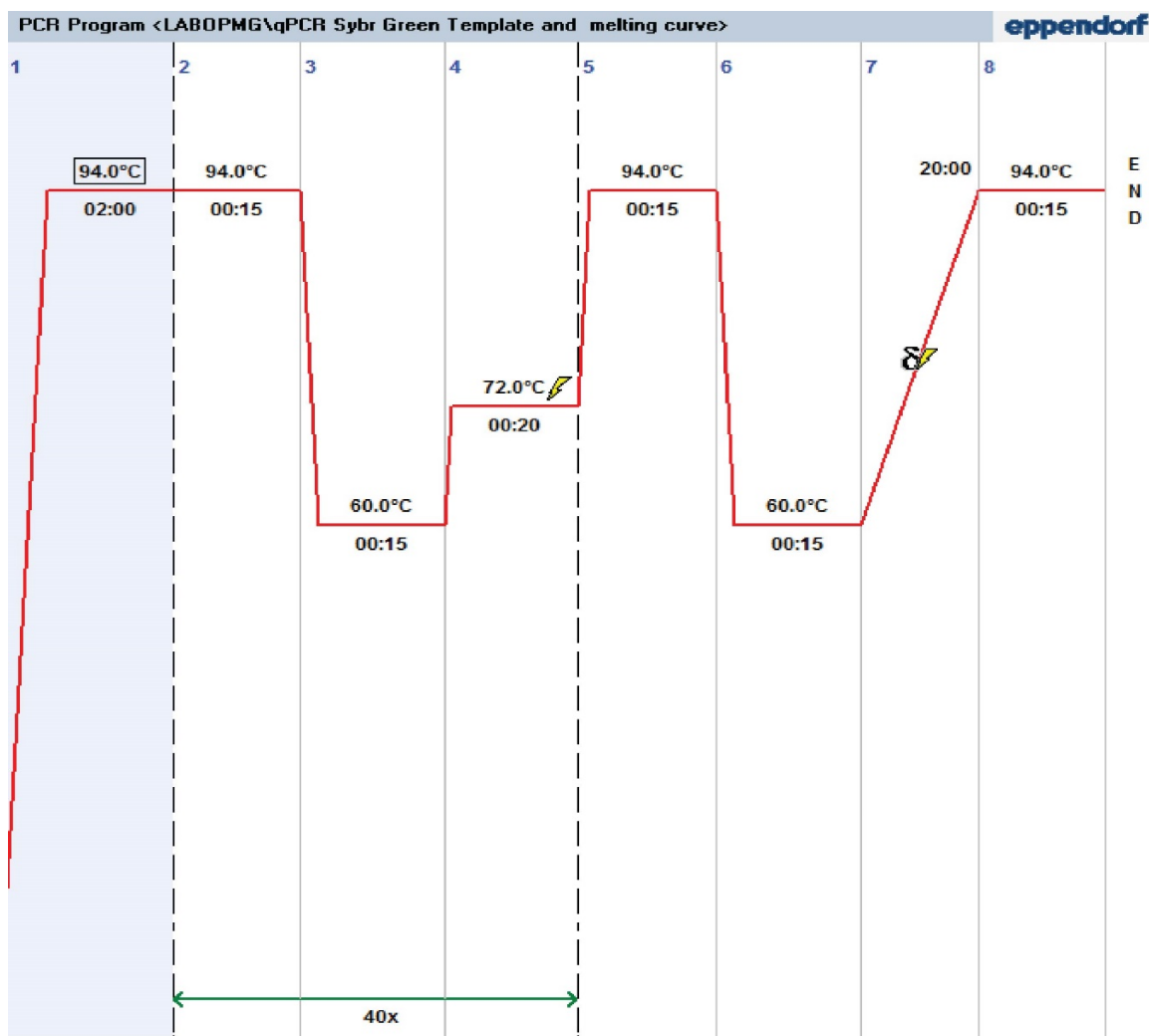


Figure 20 : Programme pour le qPCR

Représentation graphique des temps et températures pour les différents cycles de la qPCR. La première étape est de 2 min à 94 °C, puis un cycle de 15 s à 94 °C, 15 s à 60 °C et 20 s à 72 °C est répété quarante fois. La réaction est terminée avec une séquence de 15 s à 94 °C, 15 s à 60 °C et 15 s à 94 °C.

2.10 Analyses statistiques

Tous les graphiques ainsi que les analyses statistiques ont été faites avec le logiciel GraphPad Prisme 7. Les analyses statistiques effectuées sont des ANOVA simples ou des test T-Student non-pairés et les résultats ont été considérés statistiquement significatifs à $P < 0,05$. Toutes les données sont présentées en moyenne \pm SEM (erreur type de la moyenne).

RÉSULTATS

3.1 Essais de prolifération cellulaire

L'exposition des BAEC à des concentrations élevées de glucose a été évaluée sur les effets pro-angiogéniques du VEGF. Un des phénomènes importants impliqué dans l'angiogenèse et induit par le VEGF est la prolifération des cellules endothéliales. La prolifération cellulaire a en premier lieu été mesurée par décompte cellulaire. En normoxie, une stimulation au VEGF 25 ng/ml a induit une augmentation de la prolifération cellulaire de $63 \% \pm 4\%$ la lorsque les cellules endothéliales étaient exposées à des concentrations normales de glucose. Toutefois, lorsque les cellules endothéliales étaient exposées à des concentrations élevées de glucose, les effets du VEGF sur la prolifération cellulaire étaient complètement diminués (Figure 21A). La prolifération cellulaire a également été mesurée en hypoxie. Une stimulation au VEGF, en condition normale de glucose, a provoqué une augmentation de la prolifération cellulaire de $84\% \pm 10\%$. Tout comme en normoxie, les effets du VEGF sur la prolifération cellulaire étaient complètement réduits en condition élevée de glucose (Figure 21B).

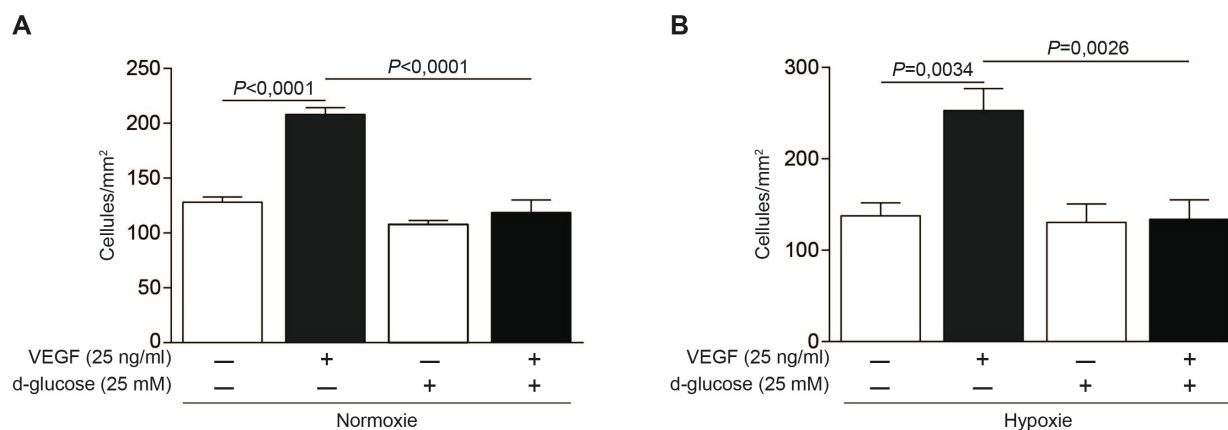


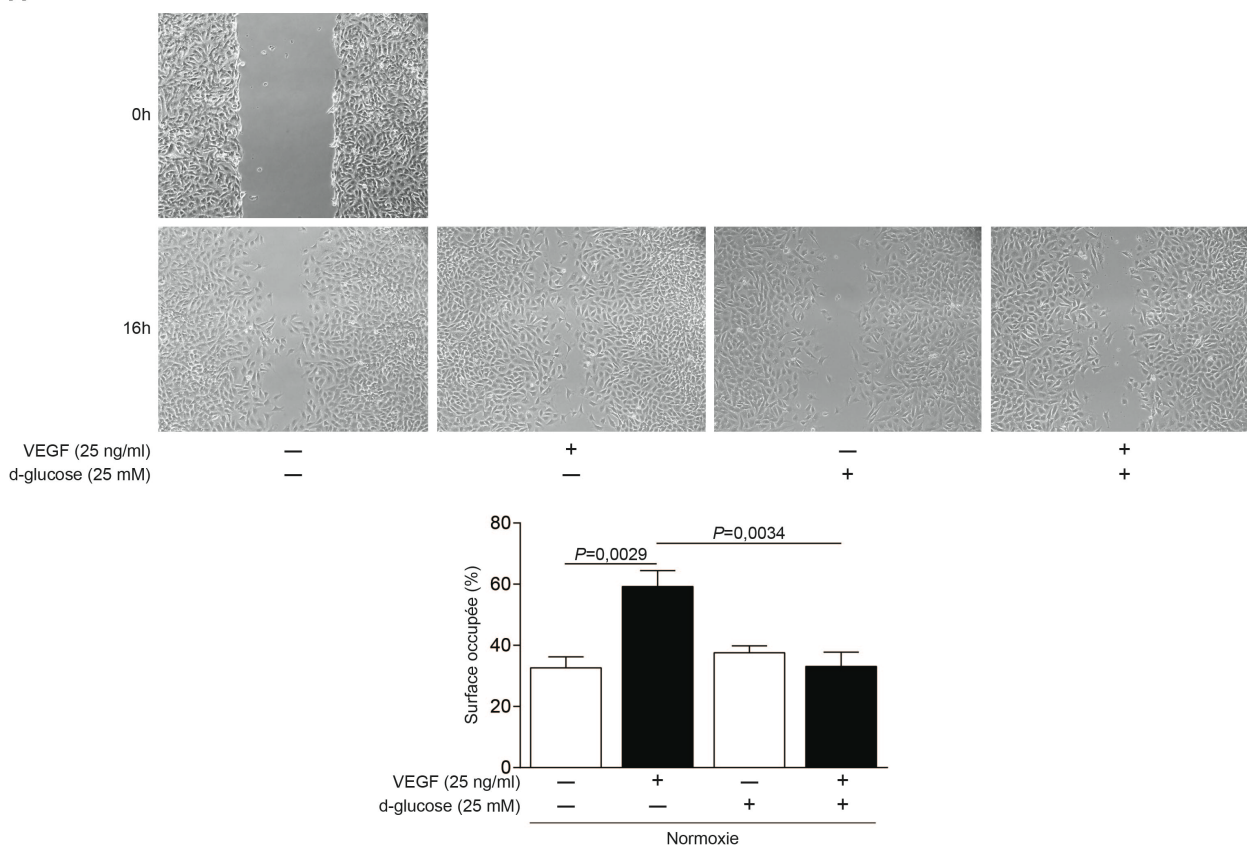
Figure 21 : Effets de concentrations élevées de glucose sur la prolifération cellulaire induite par le VEGF

Niveau de prolifération cellulaire (cellules/mm²) des BAEC. Les BAEC ont été exposées à des concentrations normales (NG : 5,6 mM) ou élevées (HG : 25 mM) de glucose pendant 48h. Les BAEC ont été stimulées au VEGF 25 ng/ml en normoxie (n=6) (A) ou en hypoxie (n=6) (B) pour les dernières 24h. Les cellules ont par la suite été fixées puis colorées au DAPI et comptées au microscope à fluorescence. Les résultats montrent la moyenne \pm SEM. P =ANOVA simple.

3.2 Essais de migration cellulaire

Afin d'évaluer les effets de concentrations élevées de glucose au niveau des processus angiogéniques, des essais de migration furent effectués en normoxie et en hypoxie. En concentration normale d'oxygène et de glucose, tel que l'illustre la figure 22A, une stimulation au VEGF 25 ng/ml a induit une augmentation de la migration cellulaire de $81\% \pm 11\%$. En revanche, en condition élevée de glucose, les capacités du VEGF à induire la migration cellulaire étaient réduites de $98\% \pm 14\%$. En hypoxie et en condition normale de glucose, une stimulation au VEGF a induit une augmentation de la migration des cellules endothéliales de $27\% \pm 6\%$. Les effets mitogéniques du VEGF étaient complètement réduits en condition élevée de glucose (Figure 22B). Toujours en hypoxie, la migration cellulaire était significativement réduite chez les cellules exposées en condition élevée de glucose en comparaison à celles exposées en conditions normales de glucose ($p < 0,0065$) (Figure 22B).

A



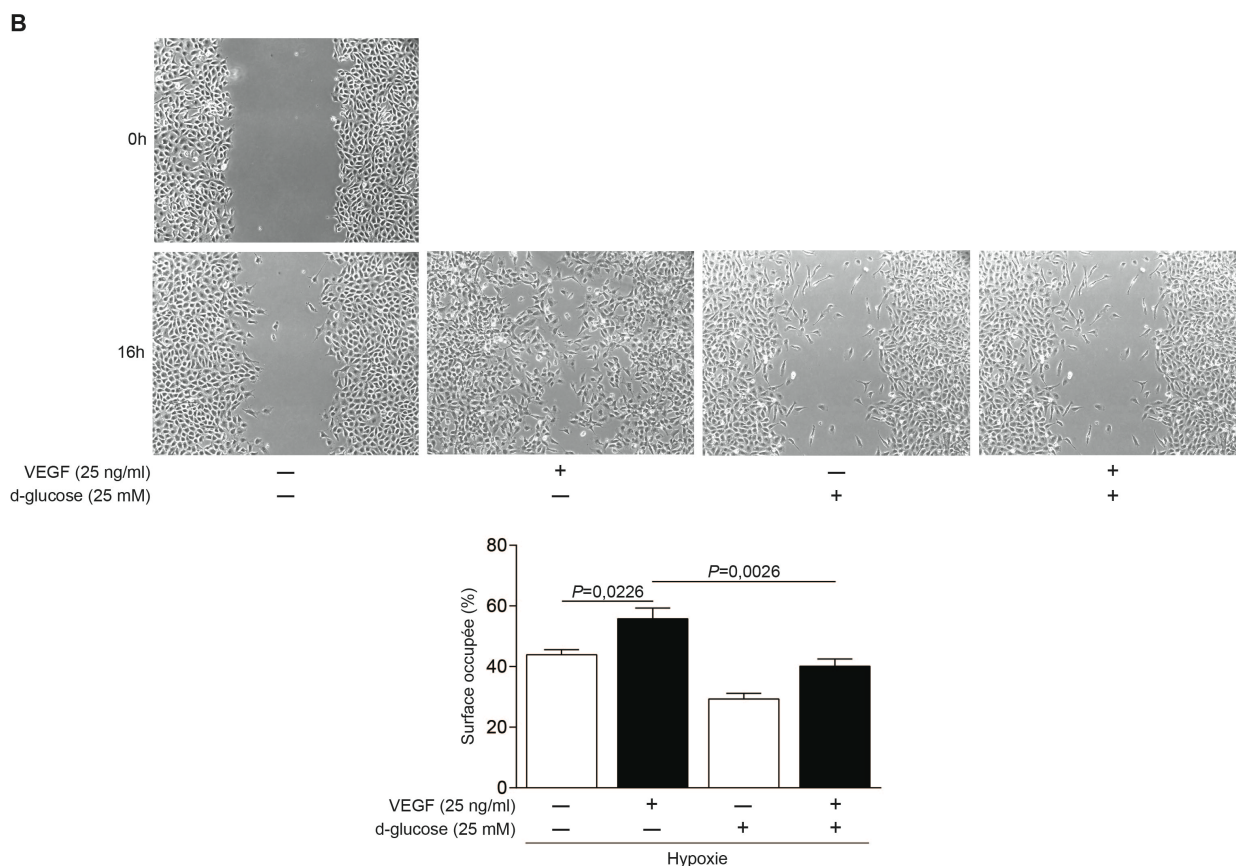


Figure 22 : Effets de concentrations élevées de glucose sur la migration cellulaire induite par le VEGF

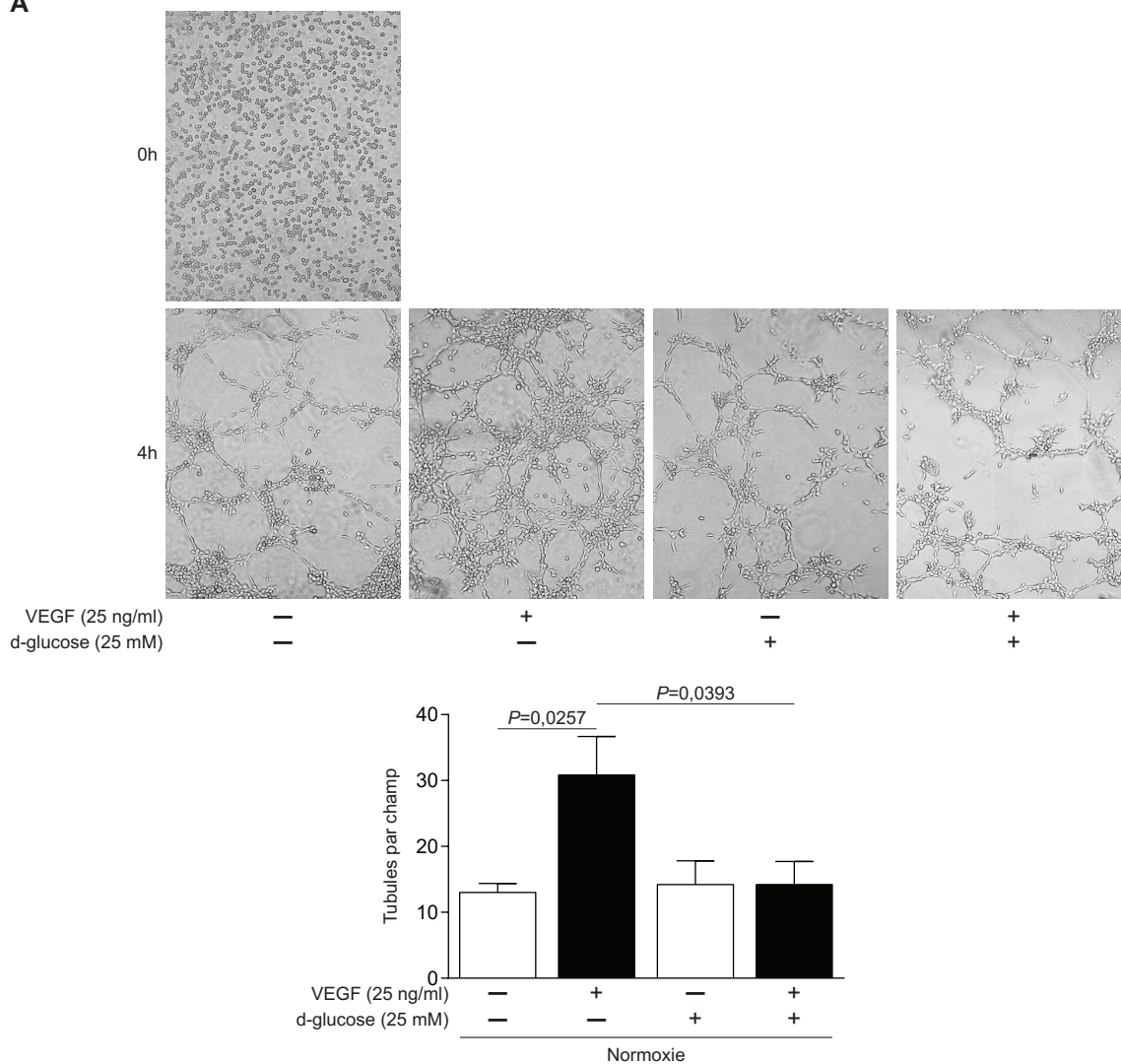
Niveau de migration (%) des BAEC. Les BAEC ont été exposées à des concentrations normales (NG : 5,6 mM) ou élevées (HG : 25 mM) de glucose pendant 24h. Les inserts ont ensuite été retirés et les BAEC stimulées au VEGF 25 ng/ml en normoxie (n=6) (A) ou en hypoxie (n=7) (B) pour les 16 dernières heures avec des concentrations normales ou élevées de glucose. Des photos ont été prises au temps 0h, soit immédiatement après le retrait de l'insert et avant la stimulation au VEGF, puis à la fin de l'expérimentation. La surface occupée (%) par les BAEC a été quantifiée par la suite. Les résultats montrent la moyenne \pm SEM. P =ANOVA simple.

3.3 Essais d'angiogenèse sur matrigel

Un autre phénomène très important dans le processus d'angiogenèse est bien évidemment la formation de tubules. Puisqu'une réduction des effets du VEGF fut observée en condition élevée de glucose pour les essais de prolifération et de migration cellulaire, des essais d'angiogenèse furent réalisés. Il est possible d'observer sur la figure 23A une augmentation de $137\% \pm 19\%$ du nombre de tubules suite à une stimulation au VEGF 25 ng/ml en condition normale de glucose et normale d'oxygène. Tel qu'attendu, les effets pro-angiogéniques du VEGF étaient réduits (-93%

$\pm 25\%$) en condition élevée de glucose et normales d'oxygène. Des résultats semblables furent obtenus en hypoxie. En effet, en condition normale de glucose, une stimulation au VEGF a aussi provoqué une augmentation de la formation de tubules de $100\% \pm 11\%$, un effet significativement réduit en condition élevée de glucose ($-75\% \pm 13\%$) (Figure 23B).

A



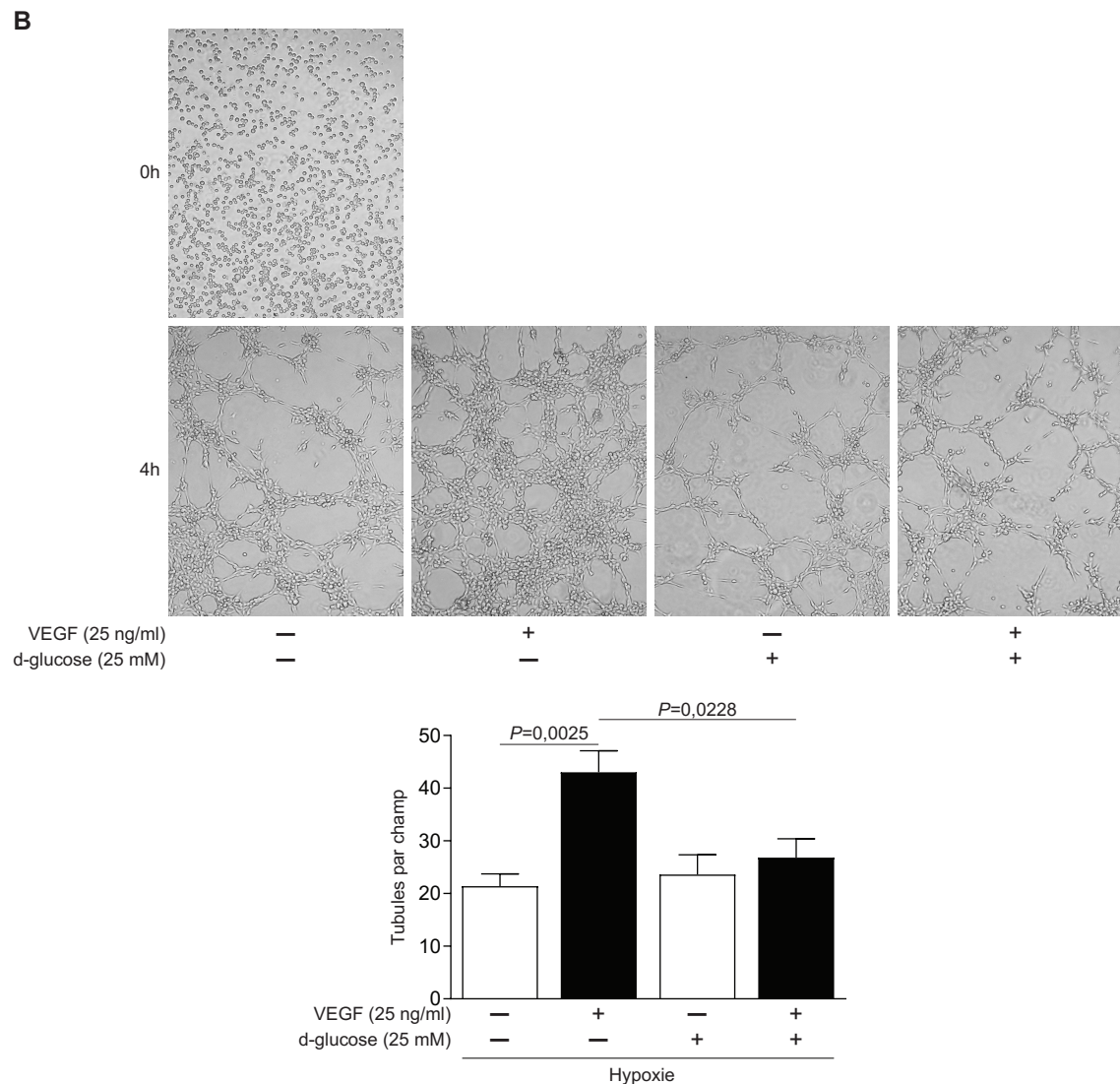


Figure 23 : Effets de concentrations élevées de glucose sur la formation de tubules induite par le VEGF

Nombres de tubules par champ formés par les BAEC. Les BAEC ont été exposées à des concentrations normales (NG : 5,6 mM) ou élevées (HG : 25 mM) de glucose 24h avant d'être ensemencées sur le matrigel. Les BAEC ont immédiatement été stimulées au VEGF 25 ng/ml en normoxie (n=5) (A) ou en hypoxie (n=5) (B) en milieu NG ou HG pendant 4h. Des photos ont été prises aux temps 0h (stimulation) et à la fin de l'expérimentation (4h). Le nombre de tubules par champ a ensuite été quantifié. Les résultats montrent la moyenne \pm SEM. P =ANOVA simple.

3.4 Signalisation du VEGF

Puisque les effets pro-angiogéniques du VEGF étaient inhibés en condition élevée de glucose, les voies de signalisation du récepteur au VEGF ont été étudiées. La phosphorylation du récepteur au VEGF (p-VEGFR2) (Figure 24A), soit son activation a été mesurée par immunobuvardage. De plus, l'activation des voies de Akt (Figure 24A et 24B) et d'ERK (Figure 24C et 24D) a été mesurée par immunobuvardage.

Une stimulation au VEGF 10 ng/ml, en concentration normale de glucose et d'oxygène, a permis d'induire une augmentation de l'activation du récepteur au VEGF (Figure 24A). Toutefois, l'exposition des BAEC à des concentrations élevées de glucose a provoqué une réduction des effets du VEGF sur l'activation du récepteur VEGFR2 (Figure 24A).

La stimulation des BAEC au VEGF 10 ng/ml a permis d'augmenter la phosphorylation d'Akt de $265\% \pm 18\%$ en condition normale de glucose et normale d'oxygène. En condition élevée de glucose, les effets du VEGF sur l'activation d'Akt étaient réduits de $66\% \pm 13\%$ (Figure 24A). Des résultats similaires ont été obtenus en hypoxie. En effet, en condition normale de glucose, une stimulation au VEGF a augmenté la phosphorylation d'Akt de $205\% \pm 11\%$, un effet réduit de $54\% \pm 16\%$ en condition élevée de glucose (Figure 24B).

En ce qui concerne la voie d'ERK, une stimulation au VEGF en condition normale de glucose et normale d'oxygène a provoqué une augmentation de $154\% \pm 12\%$ de son activation. L'exposition des BAEC en milieu avec des concentrations élevées de glucose a provoqué une réduction des effets du VEGF sur l'activation d'ERK de $76\% \pm 7\%$ (Figure 24C). Des résultats semblables ont été obtenus en hypoxie où une stimulation au VEGF a augmenté la phosphorylation d'ERK de $302\% \pm 16\%$ en condition normale de glucose et où l'exposition à des concentrations élevées de glucose a réduit les effets du VEGF de $87\% \pm 25\%$ (Figure 24D).

En ce qui concerne les voies d'Akt en normoxie et en hypoxie, l'exposition des BAEC en milieu avec des concentrations élevées de glucose a tout de même laissé place à une stimulation par le VEGF, effet absent pour la signalisation d'ERK (Figure 24A et 24B).

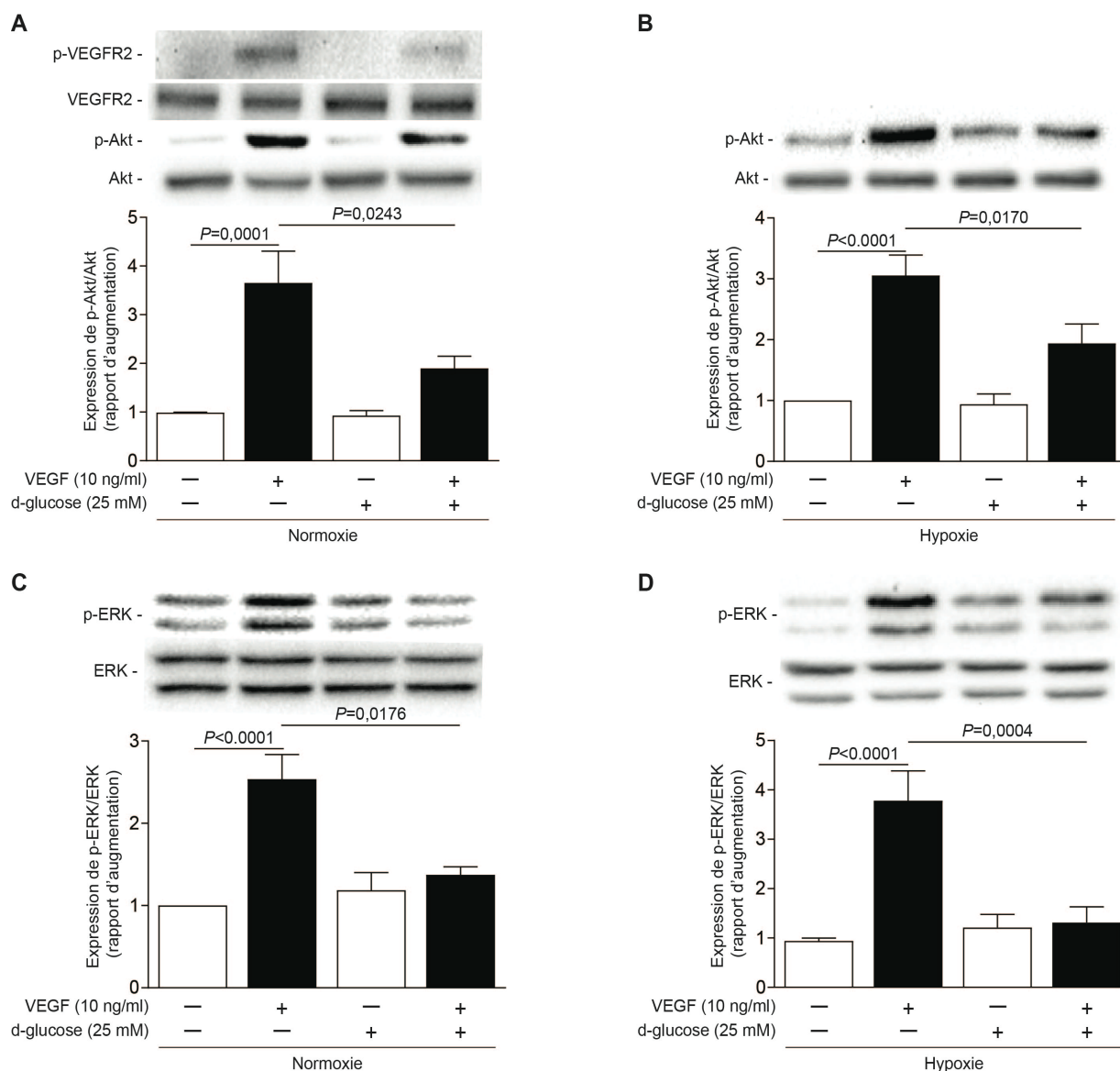


Figure 24 : Signalisation de VEGFR2, d'Akt et d'ERK

Les BAEC ont été exposées à des concentrations normales (NG : 5,6 mM) ou élevées (HG : 25 mM) de glucose pendant 24h en présence ou absence d'hypoxie pour les 16 dernières heures. Les BAEC ont ensuite été stimulées au VEGF 10 ng/ml pendant 10 min. Les niveaux d'expression des formes phosphorylées et totales de VEGFR2, d'Akt et d'ERK ont été ensuite mesurés par immunobuvardage. **A**, niveau d'expression de p-VEGFR2/VEGFR2 (n=3) et p-Akt/Akt en normoxie (n=10). **B**, niveau d'expression de p-Akt/Akt en hypoxie (n=8). **C**, niveau d'expression de p-ERK/ERK en normoxie (n=10). **D**, niveau d'expression de p-ERK/ERK en hypoxie (n=7). Les résultats montrent la moyenne \pm SEM. P =ANOVA simple.

3.5 Interaction de SHP-1

Un des mécanismes pouvant être responsable de la perte des effets pro-angiogéniques du VEGF en condition élevée de glucose est l'interaction de SHP-1 avec le récepteur au VEGF. Cette interaction a été mesurée par co-immunoprécipitation de SHP-1 en normoxie et en hypoxie. En normoxie, lorsque les BAEC sont exposées en milieu avec des concentrations élevées de glucose, l'interaction de SHP-1 avec le récepteur au VEGF était augmentée de plus de 3 fois (Figure 25A). En hypoxie, l'interaction de SHP-1 était augmentée de plus de deux fois. Ces résultats suggèrent alors que SHP-1 serait activée par l'exposition des BAEC à des concentrations élevées de glucose (Figure 25B).

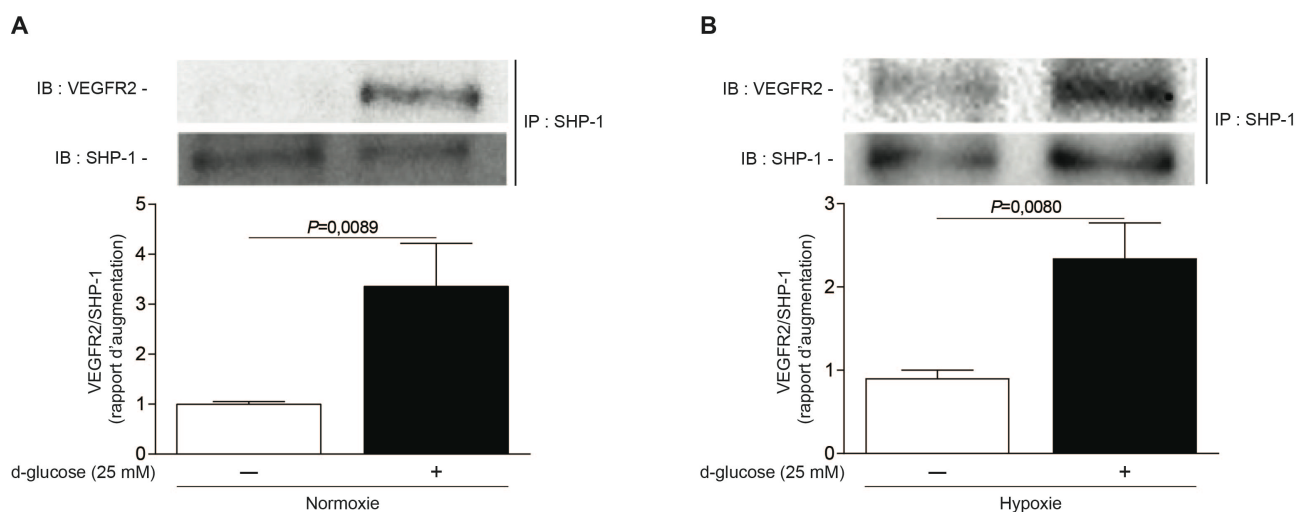


Figure 25 : Interaction de SHP-1

Niveau d'interaction de SHP-1 avec le récepteur au VEGF (VEGFR2/SHP-1). Les BAEC ont été exposées à des concentrations normales (NG : 5,6 mM) ou élevées (HG : 25 mM) de glucose pendant 24h et en normoxie (n=5) (A) ou en hypoxie (n=6) (B) pour les 16 dernières heures. Une co-immunoprécipitation de SHP-1 a ensuite été réalisée et l'expression de VEGFR2 et de SHP-1 a été mesurée par immunobuvardage. Les résultats montrent la moyenne \pm SEM. P =test T-Student non-pairé.

3.6 Activité phosphatase de SHP-1

L'activation de SHP-1 est un autre mécanisme pouvant être responsable de la perte des effets pro-angiogéniques du VEGF en condition élevée de glucose. Celle-ci a été mesurée grâce à des essais phosphatase. En normoxie et en hypoxie, suite au traitement des BAEC à des concentrations élevées de glucose, l'activité phosphatase de SHP-1 était augmentée de 1,6 fois. De plus, l'activité

phosphatase de SHP-1 était réduite en condition normale et élevée de glucose pour les BAEC mises en normoxie en comparaisons à celles traitées en normoxie (Figure 25).

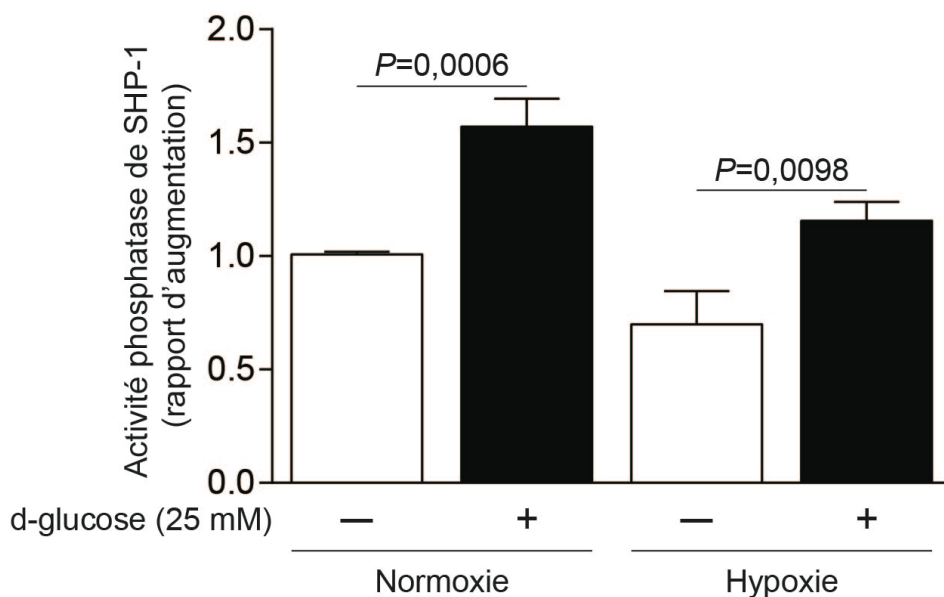


Figure 26 : Activité phosphatase de SHP-1

Niveau d'activité phosphatase de SHP-1. Les BAEC ont été exposées à des concentrations normales (NG : 5,6 mM) ou élevées (HG : 25 mM) de glucose pendant 24h et en normoxie (n=10) (A) ou en hypoxie (n=9) (B) pour les 16 dernières heures. Une co-immunoprécipitation de SHP-1 a été réalisée. L'activité phosphatase de SHP-1 a ensuite été mesurée par essai phosphatase. Les résultats montrent la moyenne \pm SEM. P =ANOVA simple.

3.7 Expression protéique des phosphatases

La hausse de l'expression des protéines tyrosines phosphatases pourrait être à l'origine de la perte des effets pro-angiogéniques du VEGF. L'expression des phosphatases SHP-1, SHP-2 et PTP1B a été mesurée par immunobuvardage chez des CE exposées en milieu avec des concentrations normales ou élevées de glucose avec ou sans hypoxie. Tel que l'indique la figure 27, aucune variation significative ne fut observée chez ces trois phosphatases lorsque les CE étaient exposées en condition normale ou élevée de glucose avec ou sans hypoxie.

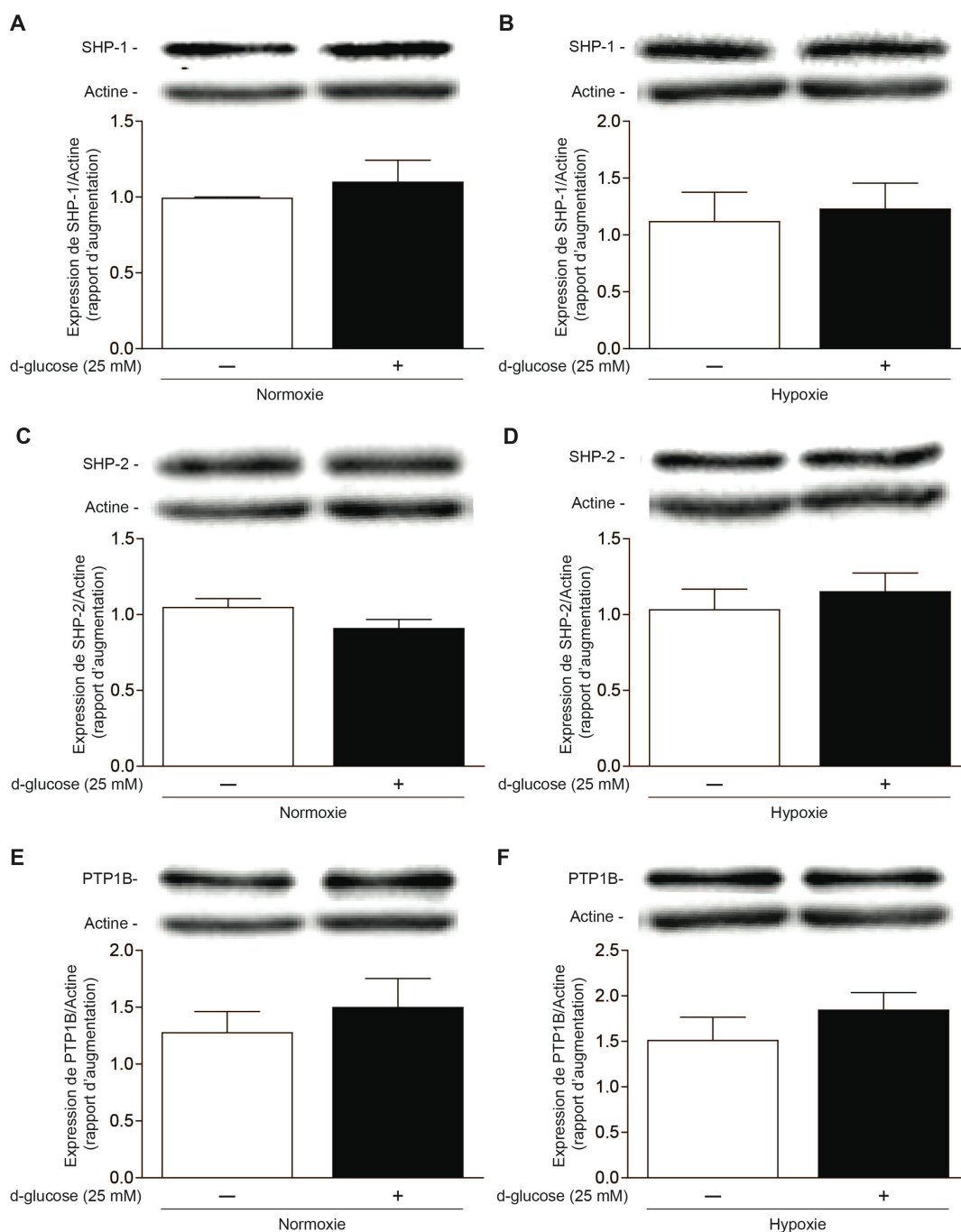


Figure 27 : Expression protéique des protéines tyrosines phosphatases

Les BAEC ont été exposées à des concentrations normales (NG : 5,6 mM) ou élevées (HG : 25 mM) de glucose pendant 24h en présence ou absence d'hypoxie pour les 16 dernières heures. L'expression protéique des protéines tyrosines phosphates a été mesurée par immunobuvardage. **A**, expression de SHP-1/Actine en normoxie (n=11). **B**, expression de SHP-1/Actine en hypoxie (n=11). **C**, expression de SHP-2/Actine en normoxie (n=16). **D**, expression de SHP-2/Actine en hypoxie (n=18). **E**, expression de PTP1B/Actine en normoxie (n=12). **F**, expression de PTP1B/Actine en hypoxie (n=10). Les résultats montrent la moyenne \pm SEM. P =test T-Student non-pairé.

3.8 Expression génique des phosphatases

La perte des effets mitogéniques du VEGF pourrait être causée par une hausse de l'expression en ARNm des protéines tyrosines phosphatases. L'expression en ARNm des phosphatases SHP-1, SHP-2, PTP1B et VE-PTP a été mesurée par qPCR chez des CE exposées en milieu avec des concentrations normales ou élevées de glucose avec ou sans hypoxie. L'expression des différentes phosphatases n'a pas varié de façon significative chez les cellules exposées en condition élevée de glucose par rapport à celles exposées en conditions normales de glucose avec ou sans hypoxie (Figure 28).

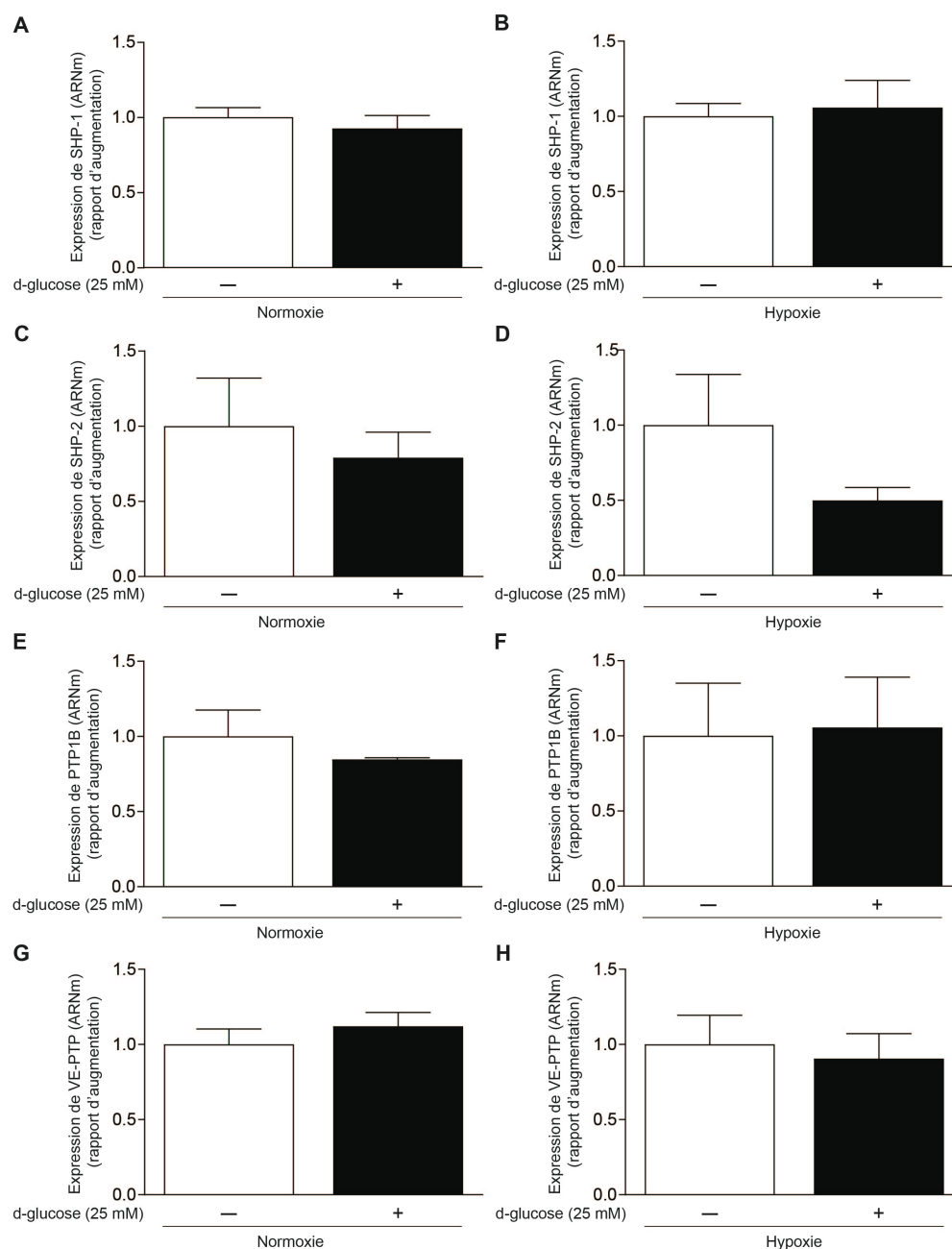


Figure 28 : Expression génique des protéines tyrosines phosphatases

Les BAEC ont été exposées à des concentrations normales (NG : 5,6 mM) ou élevées (HG : 25 mM) de glucose pendant 24h en présence ou absence d'hypoxie pour les 16 dernières heures. L'expression génique (ARNm) des protéines tyrosines phosphates a été mesurée par PCR quantitative. **A**, expression de SHP-1 en normoxie (n=7). **B**, expression de SHP-1 en hypoxie (n=7). **C**, expression de SHP-2 en normoxie (n=7). **D**, expression de SHP-2 en hypoxie (n=7). **E**, expression de PTP1B en normoxie (n=4). **F**, expression de PTP1B en hypoxie (n=4). **G**, expression de VE-PTP en normoxie (n=7). **H**, expression de VE-PTP en hypoxie (n=7). Les résultats montrent la moyenne \pm SEM. P =test T-Student non-pairé.

3.9 Surexpression d'une forme dominante-négative de SHP-1

Afin d'évaluer le rôle de SHP-1 dans la perte des effets pro-angiogéniques du VEGF, des BAEC ont été infectées avec un vecteur adénoviral permettant la surexpression d'une forme dominante-négative de SHP-1. Des CEs ont aussi été infectées avec le vecteur adénoviral contrôle, GFP. Il est important de mentionner que les graphiques de prolifération cellulaire, de migration cellulaire et de formations de tubules ne montrent pas les résultats des BAEC infectées GFP en condition élevée de glucose sans stimulation au VEGF et ne montrent pas les cellules infectées avec la forme dominante-négative de SHP-1 en condition normale de glucose et en condition élevée de glucose en absence de VEGF afin d'alléger les graphiques. Par ailleurs, les résultats pour ces conditions basales ne montraient aucune variation, justifiant ainsi leur absence dans les graphiques de quantification.

3.9.1 Essais de prolifération cellulaire

L'effet de cette surexpression a d'abord été évalué sur la prolifération des cellules endothéliales (Figure 29). En normoxie et en condition normale de glucose, chez les cellules infectées avec l'adénovirus contrôle GFP, une stimulation au VEGF a provoqué une augmentation de $69\% \pm 5\%$ de la prolifération cellulaire, un effet significativement réduit en condition élevée de glucose ($-99\% \pm 5\%$). Pour les BAEC infectées avec l'adénovirus SHP-1 dominant-négatif, une stimulation au VEGF a provoqué une augmentation de la prolifération cellulaire de $80\% \pm 4\%$ en condition normale de glucose et d'oxygène. La surexpression de la forme dominante-négative de SHP-1 en condition élevée de glucose a permis de rétablir les effets pro-prolifératifs du VEGF chez les CEs en comparaison aux cellules infectées avec l'adénovirus GFP traitées en milieu HG puis stimulées au VEGF ($+90\% \pm 6\%$) (Figure 29A). Des résultats similaires ont été obtenus en hypoxie. Une stimulation au VEGF, chez les BAEC infectées GFP, a permis d'augmenter la prolifération

cellulaire de $67\% \pm 4\%$ en condition normale de glucose, un effet complètement inhibé en condition élevée de glucose. Chez les BAEC infectées avec l'adénovirus SHP-1 dominant-négatif, une stimulation au VEGF a provoqué une augmentation de $83\% \pm 4\%$ de la prolifération cellulaire en condition normale de glucose. En condition élevée de glucose, une stimulation au VEGF a permis de rétablir les effets pro-angiogéniques du VEGF, en comparaison aux cellules infectées avec l'adénovirus GFP traitées en milieu HG puis stimulées au VEGF ($+101\% \pm 6\%$) (Figure 29B).

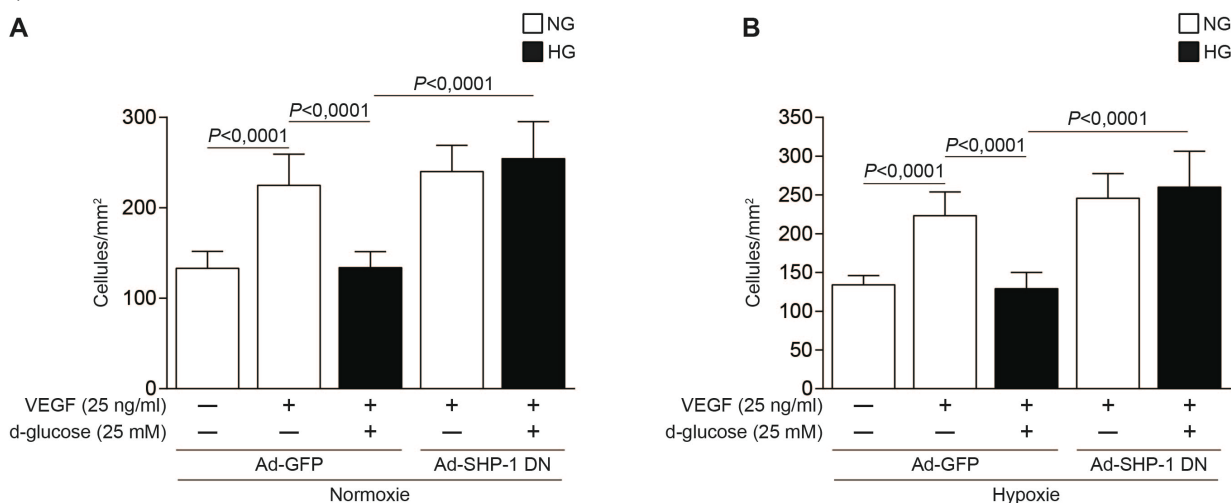


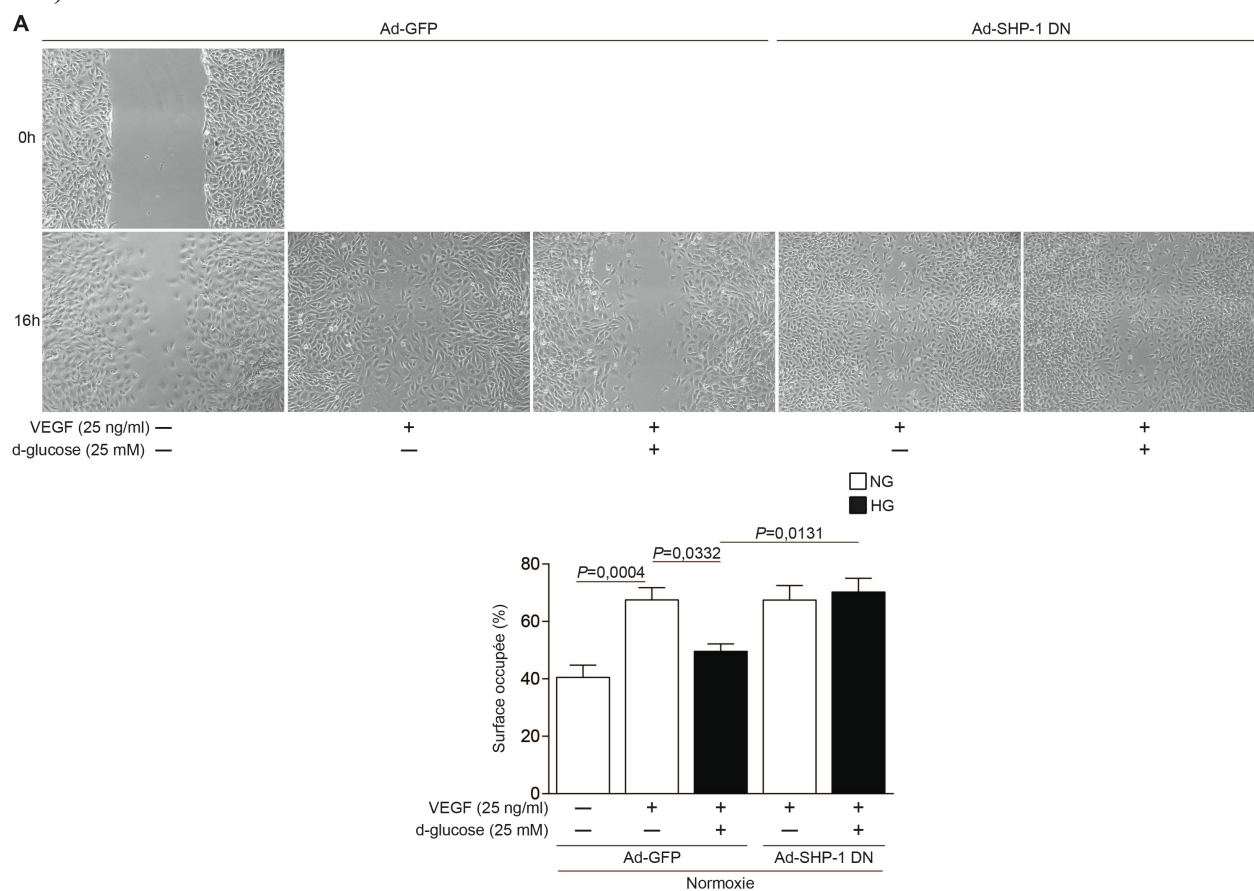
Figure 29 : Prolifération cellulaire chez des BAEC infectées avec une forme dominante-négative de SHP-1

Niveau de prolifération cellulaire (cellules/mm²) des BAEC. Les BAEC ont été infectées avec l'adénovirus GFP (Ad-GFP) et l'adénovirus SHP-1 dominant-négatif (Ad-SHP-1 DN) à raison de 100 MOI. Après une période de 48h suivant l'infection, les BAEC ont été ensemencées dans des plaques 96 puits. Une fois adhérentes les BAEC ont été exposées à des concentrations normales (NG : 5,6 mM) ou élevées (HG : 25 mM) de glucose pendant 48h. Les BAEC ont été stimulées au VEGF 25 ng/ml en normoxie (n=8) (A) ou en hypoxie (n=10) (B) pour les dernières 24h. Les cellules ont par la suite été fixées puis colorées au DAPI et comptées au microscope à fluorescence. Les résultats montrent la moyenne \pm SEM. P =ANOVA simple.

3.9.2 Essais de migration cellulaire

L'effet de la surexpression d'une forme dominante-négative de SHP-1 a ensuite été évalué sur la migration des cellules endothéliales d'aortes bovines (Figure 30). Une stimulation au VEGF en condition normale de glucose et d'oxygène a provoqué une augmentation de $67\% \pm 11\%$ de la migration des BAEC infectées GFP, un effet réduit en condition élevée de glucose ($-67\% \pm 5\%$). Chez les cellules exposées à des concentrations normales de glucose et infectées avec l'adénovirus

SHP-1 dominant-négatif, une stimulation au VEGF a induit une augmentation de $66\% \pm 8\%$ de la migration cellulaire. Cet effet a également été observé en condition élevée de glucose à la suite d'une stimulation au VEGF où une augmentation de $42\% \pm 7\%$ de la migration cellulaire a été mesurée, en comparaison aux cellules infectées avec l'adénovirus contrôle GFP traitées en milieu HG puis stimulées au VEGF (figure 30A). Des résultats comparables ont été obtenus en hypoxie. Une stimulation au VEGF en condition normale de glucose a engendré une augmentation de $57\% \pm 11\%$ de la migration cellulaire chez les BAEC infectées avec l'adénovirus GFP. Cet effet était complètement diminué en condition élevée de glucose. Les cellules infectées avec l'adénovirus SHP-1 dominant-négatif ont migré davantage en condition normale de glucose après une stimulation au VEGF ($+72\% \pm 11\%$). L'infection avec la forme dominante-négative de SHP-1 a permis d'augmenter de $74\% \pm 6\%$ la migration induite par le VEGF en condition élevée de glucose en comparaison aux BAECs infectées GFP traitées en milieu HG puis stimulées au VEGF (Figure 30B).



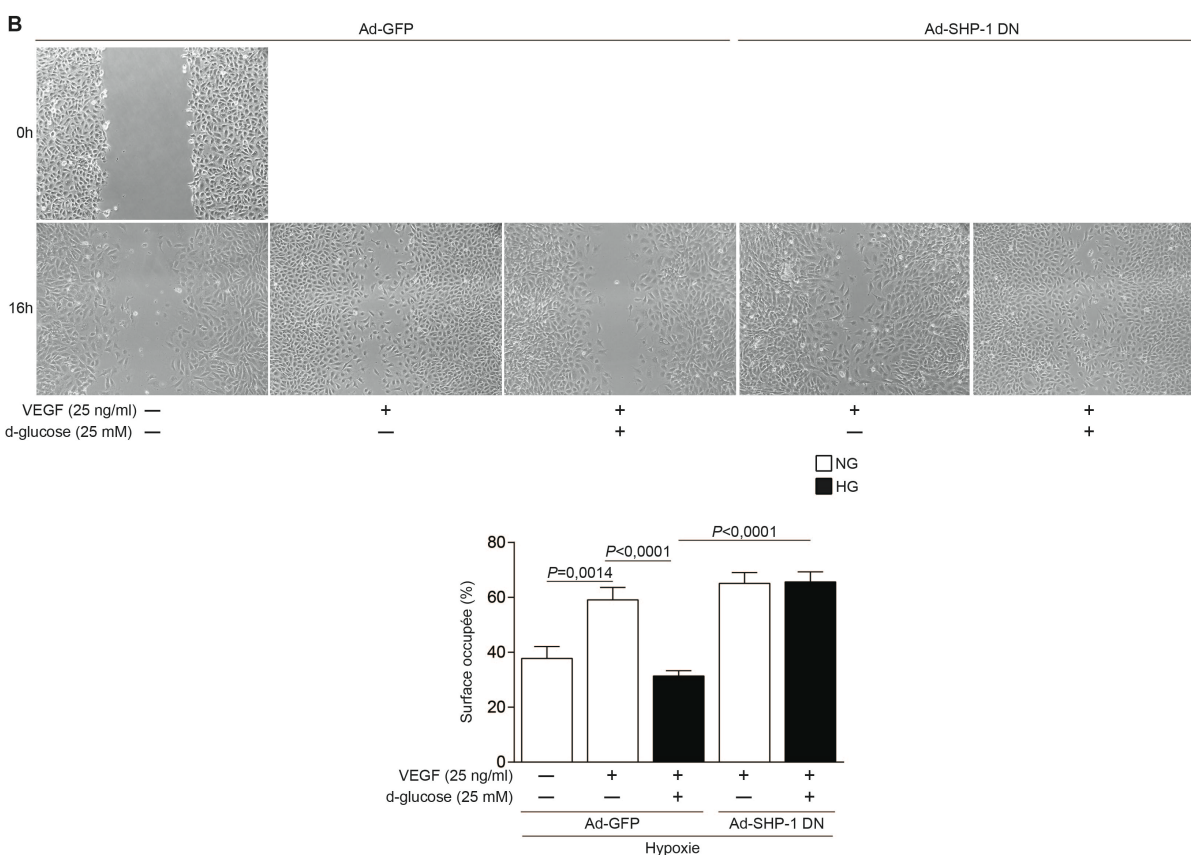


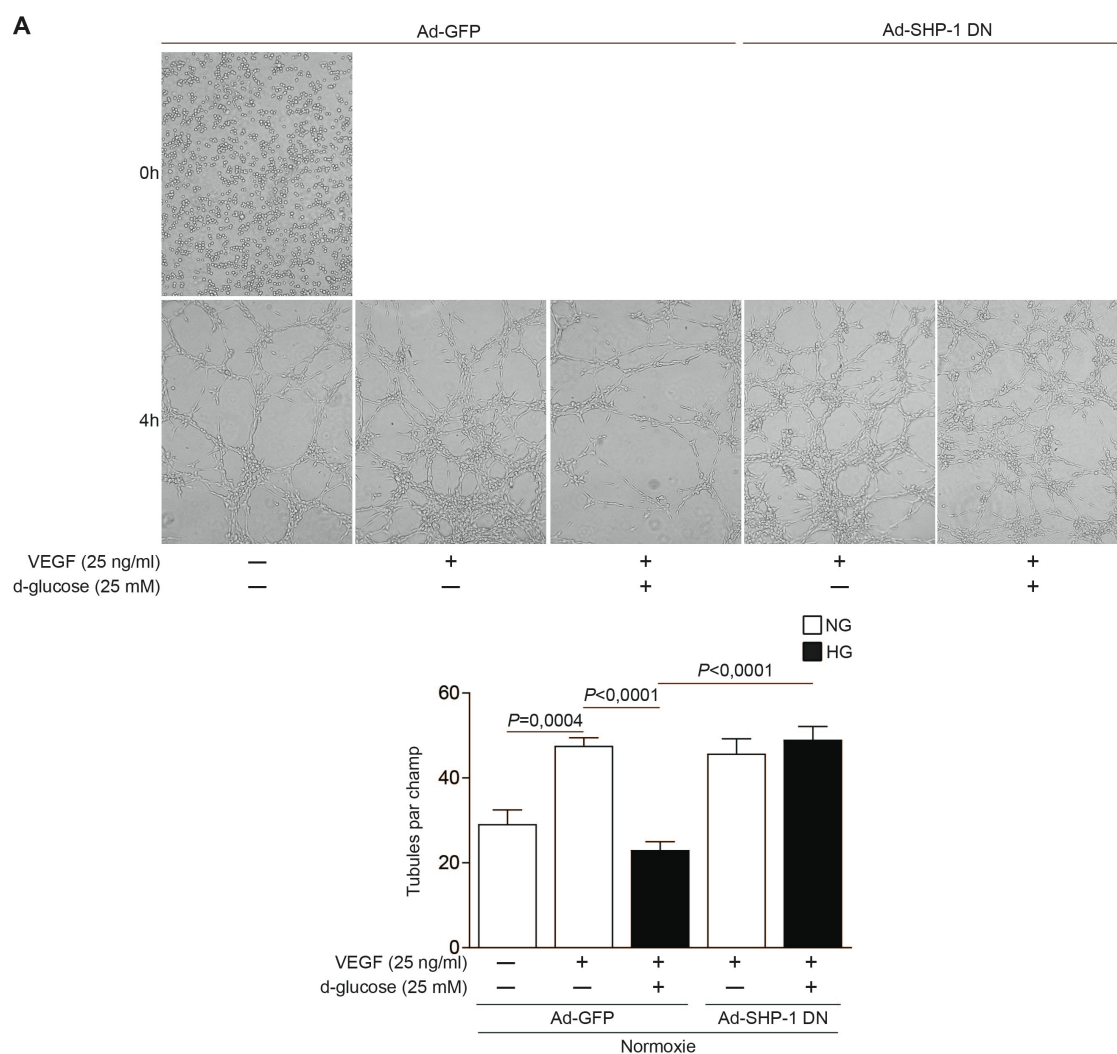
Figure 30 : Migration cellulaire chez des BAEC infectées avec une forme dominante-négative de SHP-1

Niveau de migration (%) des BAEC. Les BAEC ont été infectées avec l'adénovirus GFP (Ad-GFP) et l'adénovirus SHP-1 dominant-négatif (Ad-SHP-1 DN) à raison de 100 MOI. Après une période de 48h suivant l'infection, les BAEC ont été ensemencées dans des inserts. Les BAEC ont été exposées à des concentrations normales (NG : 5,6 mM) ou élevées (HG : 25 mM) de glucose pendant 24h. Les inserts ont ensuite été retirés et les BAEC stimulées au VEGF 25 ng/ml en normoxie (n=8) (A) ou en hypoxie (n=10) (B) pour les 16 dernières heures avec des concentrations normales ou élevées de glucose. Des photos ont été prises au temps 0h, soit immédiatement après le retrait de l'insert et avant la stimulation au VEGF, puis à la fin de l'expérimentation. La surface occupée (%) par les BAEC a été quantifiée par la suite. Les résultats montrent la moyenne \pm SEM. P =ANOVA simple.

3.9.3 Essais d'angiogenèse

La surexpression d'une forme dominante-négative de SHP-1 a aussi été évaluée sur la formation de tubules par les CE (Figure 31). En normoxie, une stimulation au VEGF a augmenté de 63 % \pm 12% la formation de tubules chez les BAEC exposées en milieu avec des concentrations normales de glucose et infectés GFP. Les effets du VEGF sur la formation de tubules étaient complètement réduits chez les BAEC exposées en milieu avec des concentrations élevées de glucose. Pour les cellules infectées avec la forme dominante-négative de SHP-1, une stimulation au VEGF a

provoqué une augmentation de la formation de tubules de $57\% \pm 12\%$ en concentrations normales de glucose. Toutefois, chez les cellules exposées en milieu avec des concentrations élevées de glucose, les effets du VEGF sur la formation de tubules étaient rétablis en comparaison aux BAEC infectées GFP et traitées en HG+VEGF ($+68\% \pm 9\%$) (Figure 31A). En hypoxie, une stimulation au VEGF a favorisé la formation de tubules chez les BAEC infectées avec l'adénovirus contrôle et traitées en milieu avec des concentrations normales de glucose ($+56\% \pm 7\%$). Cet effet était complètement diminué en condition élevée de glucose. L'infection des BAEC avec la forme dominante-négative de SHP-1 a induit une augmentation de la formation de tubules à la suite d'un traitement en milieu normal de glucose avec stimulation au VEGF ($+42\% \pm 5\%$). Les capacités du VEGF à induire la formation de tubules étaient rétablies en condition élevée de glucose chez les cellules infectées avec l'adénovirus SHP-1 dominant-négatif en comparaison aux BAEC infectées GFP et traitées en HG+VEGF ($+48\% \pm 11$) (Figure 31B).



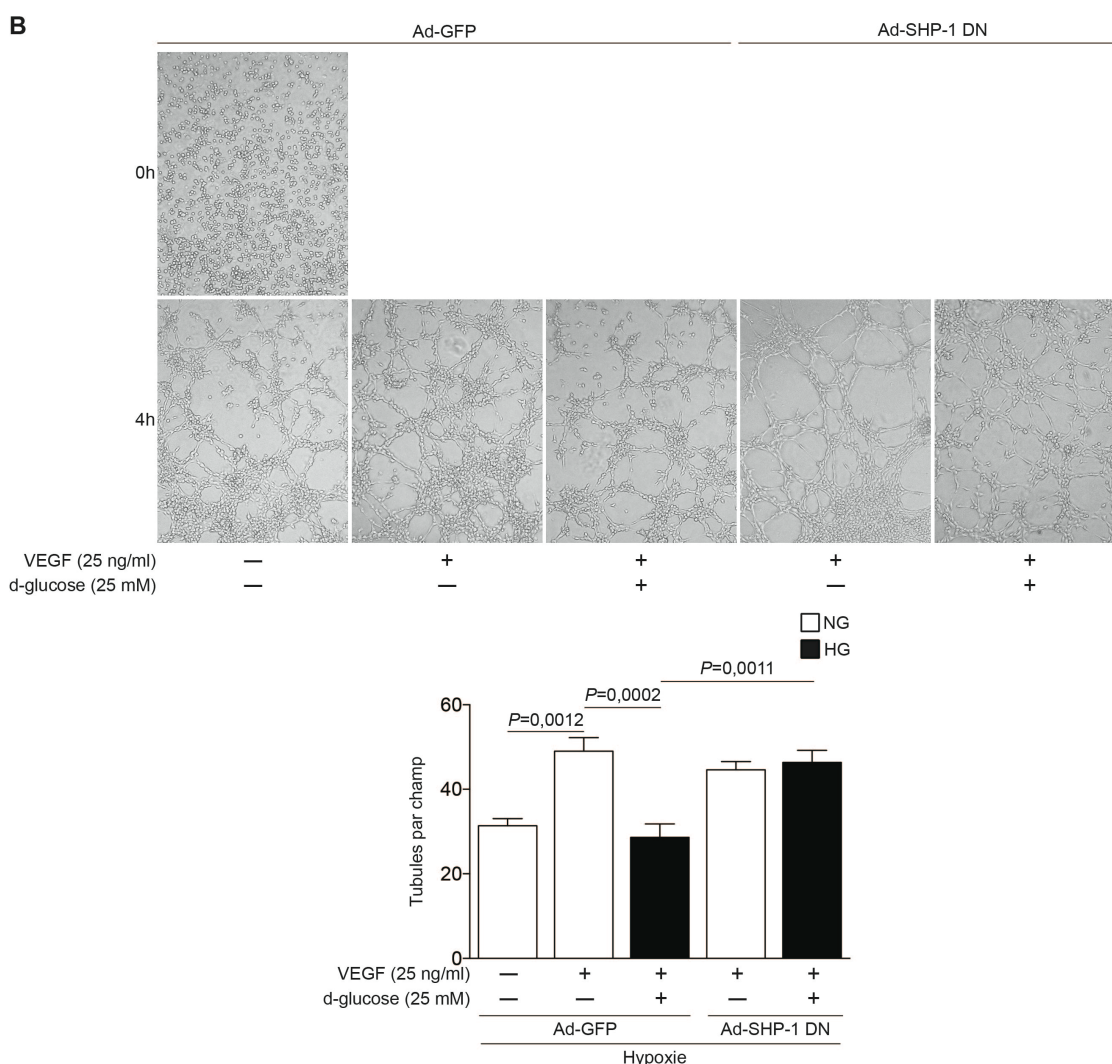


Figure 31 : Formation de tubules chez des BAEC infectées avec une forme dominante-négative de SHP-1

Nombres de tubules par champ formés par les BAEC. Les BAEC ont été infectées avec l'adénovirus GFP (Ad-GFP) et l'adénovirus SHP-1 dominant-négatif (Ad-SHP-1 DN) à raison de 100 MOI. Après une période de 24h suivant l'infection, les BAEC ont été exposées à des concentrations normales (NG : 5,6 mM) ou élevées (HG : 25 mM) de glucose pour une durée de 24h. Les BAEC ont ensuite étéensemencées sur matrigel et immédiatement stimulées au VEGF 25 ng/ml en normoxie (n=7) (A) ou en hypoxie (n=5) (B) en milieu NG ou HG pendant 4h. Des photos ont été prises aux temps 0h (stimulation) et à la fin de l'expérimentation (4h). Le nombre de tubules par champ a ensuite été quantifié. Les résultats montrent la moyenne \pm SEM. P =ANOVA simple.

3.9.4 Signalisation du VEGF

Tel que montré précédemment, la surexpression d'une forme dominante-négative de SHP-1 a permis de rétablir les effets pro-angiogéniques du VEGF. L'effet de cette surexpression a également été étudié sur les voies de signalisation cellulaire du VEGF en normoxie. Lorsqu'exposés à des concentrations normales de glucose et infectées avec l'adénovirus GFP, une

stimulation des BAEC au VEGF a provoqué une augmentation de la phosphorylation d'Akt, un effet réduit en conditions élevées de glucose. Lorsqu'infectées avec l'adénovirus SHP-1 dominant-négatif, une stimulation au VEGF en conditions normales de glucose a favorisé l'activation d'Akt, un effet qui semble avoir été restauré en milieu avec des concentrations élevées de glucose. Puisqu'il s'agit ici d'une seule expérimentation, d'autres devront être réalisées afin de confirmer le phénomène (Figure 32A). De plus, une stimulation au VEGF en condition normale de glucose chez des BAEC infectées avec l'adénovirus GFP a favorisé l'activation d'ERK, un effet réduit en conditions élevées de glucose. Une stimulation au VEGF a favorisé l'augmentation de la phosphorylation d'ERK tant en concentrations normales qu'élevées de glucose chez des BAEC infectées avec l'adénovirus SHP-1 dominant-négatif. D'autres expérimentations devront être effectuées pour confirmer que cette surexpression permet de rétablir les effets du VEGF sur l'activation d'ERK en conditions élevées de glucose (Figure 32B).

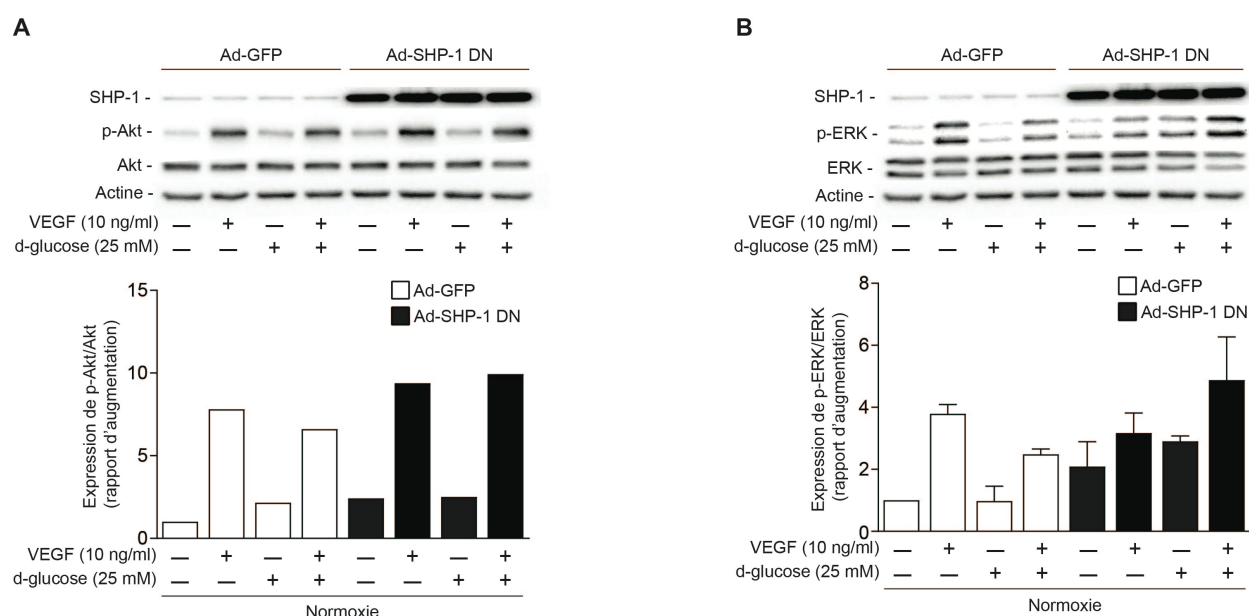


Figure 32 : Signalisation d'Akt et d'ERK chez des BAEC infectées avec une forme dominante-négative de SHP-1

Les BAEC ont été infectées avec l'adénovirus GFP (Ad-GFP) et l'adénovirus SHP-1 dominant-négatif (Ad-SHP-1 DN) à raison de 100 MOI. Les BAEC ont été ensemencées dans des plaques 6 puits 24h suivant l'infection. Une fois adhérentes, soit 24h plus tard, les BAEC ont été exposées à des concentrations normales (NG : 5,6 mM) ou élevées (HG : 25 mM) de glucose pendant 24h en présence ou absence d'hypoxie pour les 16 dernières heures. Les BAEC sont ensuite stimulées au VEGF 10 ng/ml pendant 10 min. Les niveaux d'expression des formes phosphorylées et totales d'Akt et d'ERK ont ensuite été mesurés. **A**, niveau d'expression de p-Akt/Akt en normoxie (n=1). **B**, niveau d'expression de p-ERK/ERK en normoxie (n=3). Les résultats montrent la moyenne \pm SEM.

DISCUSSION

Dans la présente étude, nous avons démontré que l'exposition des BAECs à des concentrations élevées de glucose a réduit les effets du VEGF sur la migration cellulaire, la prolifération cellulaire et la formation de tubules. De plus, nos résultats ont montré que l'exposition des BAECs à des concentrations élevées de glucose a diminué les effets du VEGF sur l'activation d'Akt, d'ERK et aussi du récepteur au VEGF (VEGFR2). Cette réduction des effets mitogéniques du VEGF en condition élevée de glucose était accompagnée d'une augmentation de l'interaction de SHP-1 avec le VEGFR2 ainsi que d'une hausse de l'activité phosphatase de SHP-1. Nous avons posé l'hypothèse que l'hyperglycémie en condition diabétique augmente l'expression ou l'activité de la protéine tyrosine phosphatase SHP-1 menant à une inhibition de la réponse des récepteurs aux facteurs de croissance en conditions hypoxiques, dont le VEGF, provoquant ainsi une perturbation de l'angiogenèse. Nous n'avons pas observé de variation de l'expression de SHP-1 lorsque les BAECs étaient exposées à des concentrations élevées de glucose. Nos résultats ont donc supporté notre hypothèse puisque nous avons montré une hausse en condition élevée de glucose de l'activité phosphatase de SHP-1 et de l'interaction de SHP-1 avec VEGFR2 bien que l'expression de SHP-1 demeure inchangée. Afin de prouver le rôle de SHP-1 dans la perte des phénomènes angiogéniques du VEGF en concentration élevée de glucose, nous avons surexprimé une forme dominante-négative de SHP-1 dans les BAECs. Nos résultats ont montré que la surexpression d'une forme dominante-négative de SHP-1 a permis de rétablir les effets du VEGF sur la prolifération cellulaire, la migration cellulaire et la formation de tubules en concentration élevée de glucose, prouvant le rôle de SHP-1 dans la dérégulation de l'angiogenèse.

Effets de l'hyperglycémie et de l'hypoxie sur les effets mitogéniques du VEGF

L'effet du diabète sur la revascularisation suivant l'ischémie du membre inférieur a été évalué dans une étude publiée en 1999. Des souris diabétiques de type 1 non-obèses (NOD) ont montré une récupération du flot sanguin inférieure par rapport aux souris non-diabétiques (Rivard et al., 1999). Nous avons publié des résultats similaires (Lizotte et al., 2013) montrant que les souris ayant un diabète induit par la streptozotocine (STZ), un agent qui détruit les cellules bêta du pancréas, avaient un rétablissement du flot sanguin inférieur en comparaison aux souris non-diabétique. L'étude de Lizotte et al (2013) a montré l'implication de PKC- δ dans la perte d'angiogenèse en condition diabétique suite à une ischémie du membre inférieur.

L'angiogenèse est un processus physiologique complexe impliquant la prolifération cellulaire, la migration cellulaire et la formation de tubules. Nos résultats ont démontré que l'exposition des BAECs en condition élevée de glucose (25 mM) réduit significativement les effets du VEGF (25 ng/ml) sur la prolifération cellulaire (voir Figure 21), la migration cellulaire (voir Figure 22) et la formation de tubules (voir Figure 23) tant en normoxie qu'en hypoxie. Bernatchez et al (1999) a montré que le VEGF induit *in vitro* une augmentation de la prolifération et de la migration des BAECs suite à une stimulation au VEGF. De plus, les effets du VEGF sur l'induction de la formation de tubules chez les CE ont également été démontrés *in vitro* (Geraldès et al., 2007). Nos résultats confirment cet effet du VEGF sur l'induction de la prolifération cellulaire, de la migration cellulaire et de la formation de tubules en concentrations normales de glucose.

Une étude utilisant des HUVECs exposées à des concentrations élevées de glucose n'a pas montré de réduction des effets du VEGF sur la prolifération cellulaire, la migration cellulaire et la formation de tubules (Zhou et al., 2016). Les résultats de Zhou et al (2016) ne vont pas dans le même sens que ceux obtenus dans notre étude. En ce qui concerne les essais de prolifération cellulaire, Zhou et al (2016) ontensemencées 3 000 cellules par puits qui ont été sevrées le lendemain, soit seulement 8h avant d'être stimulées au VEGF pour un total de 48h en concentrations élevées de glucose. Dans notre étude, nous ensemencions 5000 cellules par puits et ces dernières étaient sevrées 4h suivant l'ensemencement afin d'éviter une prolifération additionnelle des cellules. Nos BAEC étaient sevrées pour une période de 24h en concentration élevée de glucose avant de les stimuler au VEGF pour une durée totale de 24h. Le fait de laisser les HUVECs jusqu'au lendemain dans du milieu de culture contenant des concentrations de FBS de 5% a probablement induit une augmentation du nombre de cellules, car les facteurs de croissance présents dans le FBS ont certainement activé des voies de signalisation impliquées dans la prolifération cellulaire. De plus, un sevrage de 8h semble court et pourrait avoir mené à une surestimation de l'effet du VEGF en condition élevée de glucose. Ces éléments pourraient donc expliquer pourquoi Zhou et al (2016) ont observé une augmentation de la prolifération cellulaire induite par le VEGF en concentration élevée de glucose. En ce qui concerne les essais de migration cellulaire, Zouh et al (2016) n'a pas utilisé d'inserts de type «*wound healing*», mais bien un «*24-multiwell FluoroBlok transwell insert system*». En effet, ce système de migration cellulaire

comprend deux chambres séparées par une membrane poreuse. Le VEGF est ajouté dans la chambre du bas et les cellules sont ajoutées dans la chambre du haut. Les cellules qui ont traversées cette membrane poreuse sont comptées suite à une coloration avec un marqueur fluorescent. Dans cette méthode, les cellules doivent traverser une membrane ce qui est différent que de la migration de type «*wound healing*» où les cellules vont remplir l'espace dénué de cellules après le retrait de l'insert. Il est donc difficile de comparer les résultats de ces 2 méthodes d'autant plus que leurs HUVECs étaient sevrées seulement 8h avant l'ensemencement. De plus, les HUVECs étaient stimulées au VEGF 100 ng/ml, une concentration 4 fois plus élevée que celle utilisée pour générer nos résultats. Par ailleurs, les essais de formation de tubules réalisés par Zhou et al (2016) étaient effectués dans des plaques 48 puits, un espace beaucoup plus grand que celui utilisé avec les μ slides de la compagnie *Ibibi*. Dans ces essais de formation de tubules, 20 000 cellules par puits ont été ensemencées ce qui est moindre en comparaison à 30 000 cellules par puits d'une μ slide contenant un volume de 50 μ l. En effet, une absence de contact des cellules endothéliales pourrait expliquer pourquoi ils n'ont pas observé d'augmentation significative des effets du VEGF sur la formation de tubules en concentration normale de glucose ni de réduction des effets du VEGF sur la formation de tubules en concentration élevée de glucose. À noter que les concentrations de VEGF étaient de 100 ng/ml. De plus, les cellules étaient directement ensemencées dans du milieu de culture sans sérum et incubées 8 heures. Les cellules n'ont pas été sevrées pendant 24h avant d'être ensemencées comme dans notre protocole, ce qui pourrait encore une fois expliquer les différences observées par rapport à nos résultats obtenus. Les résultats de Sultan et al (2015) ont montré que l'exposition des HUVECs à des concentrations élevées de glucose provoquait une augmentation de l'expression en ARNm du VEGF et de sa relâche. Ceci pourrait alors en quelque sorte masquer les effets inhibiteurs de l'hyperglycémie sur les effets mitogéniques induits par une stimulation au VEGF. Les résultats obtenus pourraient diverger de ceux que nous avons obtenu en raison du type cellulaire différent.

Plusieurs études ont montré que des concentrations élevées de glucose comparables à celles utilisées dans nos expérimentations réduisaient la prolifération des cellules endothéliales sur plusieurs jours en comparaison aux cellules exposées en milieu avec des concentrations normales de glucose (Curcio et Ceriello, 1992; Varma, 2005; Wang et al., 2013). Toutefois aucune différence significative n'était observée pour une période d'exposition de 48h à des concentrations

élevées de glucose. Nos résultats concordent avec ces études car l'exposition des BAECS à des concentrations élevées de glucose pendant 48h n'a mené à aucune différence significative au niveau de la prolifération cellulaire en absence de VEGF. Les résultats de Moriya et al (2015) ont démontré que la prolifération des HUVECs était significativement réduite suite à une exposition de 5 jours à des concentrations élevées de glucose (30 mM). Ces résultats pourraient être attribuables à une longue exposition à des concentrations élevées de glucose. Nos cellules étaient exposées à des concentrations élevées de glucose pour une durée de 48h. Nakamura et al (2011) a évalué l'effet de concentrations élevées de glucose sur la prolifération de cellules progénitrices endothéliales (EPCs). Les EPCs étaient cultivées en milieu avec des concentrations élevées de glucose pendant 72h (20 mM de glucose ; HG). Une réduction significative de la prolifération cellulaire a été observée chez les cellules en hyperglycémie par rapport aux EPCs traitées en concentrations normales de glucose. Ce résultat pourrait avoir été attribué au fait que les EPCs ont été traitées 24 heures de plus que nos CEs pour évaluer la prolifération cellulaire et que l'hyperglycémie aurait causé davantage de dommages aux cellules. Fait intéressant, ce groupe de recherche a montré que les effets du VEGF sur la prolifération des EPCs étaient significativement réduits en milieu avec des concentrations élevées de glucose en comparaison aux cellules exposées à des concentrations normales de glucose, un effet corroborant nos résultats obtenus dans notre modèle cellulaire.

L'effet de l'exposition des HUVECs à des concentrations élevées de glucose sur la migration et la formation de tubules a aussi été évalué par Li (2013). Les résultats publiés par Li (2013) ont montré que l'hyperglycémie réduisait significativement la migration cellulaire et la formation de tubules en comparaison aux cellules exposées à des concentrations normales de glucose. Nos résultats n'ont pas montré de différences significatives dans ces conditions, c'est-à-dire sans VEGF, tant au niveau de la migration cellulaire que de la formation de tubules. Les résultats de Li (2013) pourraient avoir été causés par l'utilisation de concentrations trop élevées de glucose. En effet, ce groupe de recherche a utilisé des concentrations de glucose de 33,3 mM, soit 8,3 mM plus élevé que ce que nous avons utilisé. Cette différence de concentration plutôt élevée pourrait avoir réduit davantage la migration et la formation de tubules en concentration élevée de glucose tel que montré par Li (2013).

Le groupe de Chen et al (2007) a évalué l'effet de concentrations élevées de glucose sur la migration induite par le VEGF dans des EPCs. Les résultats de Chen et al (2007) ont montré que l'exposition des EPCs à des concentrations élevées de glucose (25 mM) sur une période de 24h réduisaient de 37% les effets du VEGF sur la migration cellulaire. Le groupe de Warren et al (2014) a étudié l'effet de concentrations élevées de glucose (25 mM) sur la migration cellulaire chez des HUVECs. Les résultats obtenus par le groupe de Warren et al (2014) ont montré une réduction significative de la migration induite par le VEGF chez les HUVECs exposées à des concentrations élevées de glucose en comparaison aux HUVECs exposées à des concentrations normales de glucose (5 mM). Les résultats de Chen et al (2007) et de Warren et al (2014) corroborent nos résultats obtenus où l'exposition des CEs en condition élevée de glucose a réduit de façon significative les effets du VEGF sur la migration cellulaire en normoxie (Figure 22 A). Nous avons démontré (Paquin-Veillet et al., 2017) que l'exposition des BAECs en teneur élevée de glucose a permis de réduire significativement les effets du VEGF sur la prolifération et migration cellulaire en normoxie, ce qui confirme les résultats obtenus aux figures 21A et 22A.

Le groupe de Moriya et al (2015) a montré qu'une stimulation au VEGF à une concentration de 50 ng/ml augmentait la formation de tubules dans les HUVECs exposées à des concentrations normales de glucose, ce qui corrobore nos résultats. Moriya et al (2015) a aussi montré qu'une stimulation au VEGF chez des HUVECs exposées à des concentrations élevées de glucose (30 mM) a permis d'augmenter de façon significative la formation de tubules en comparaison HUVECs exposées à des concentrations élevées de glucose, mais sans stimulation au VEGF. Toutefois, le nombre de tubules formés chez les HUVECs exposées en conditions élevées de glucose avec stimulation au VEGF était inférieur au nombre de tubules formées par les HUVECs exposées en conditions normales de glucose avec stimulation au VEGF. Dans l'essai d'angiogenèse réalisé par Moriya et al (2015), on constate qu'ils ont utilisé des concentrations de VEGF de 50 ng/ml, soit le double de ce que nous avons utilisé. Cette différence de concentration pourrait expliquer pourquoi le groupe de Moriya et al (2015) a mesuré une hausse de la formation de tubules chez les HUVECs exposées à des concentrations élevées de glucose. De plus, les cellules ont été pré-traitées 5 jours en hyperglycémie avant d'être ensuiteensemencées pendant 24h pour suivre la formation de tubules dans les différentes conditions. Ces différences majeures par rapport à notre protocole décrit à la section 2.7 pourraient expliquer les résultats différents.

Nous n'avons pas observé de différences significatives entre les expérimentations réalisées en normoxie et en hypoxie, mis à part une élévation des niveaux basaux de migration cellulaire et de formation de tubules. En effet, comme discuté dans l'introduction, l'hypoxie augmente l'expression de VEGF par un mécanisme dépendant de HIF-1 α (Bento et Pereira, 2011). Il n'est donc pas surprenant de voir cette augmentation. Bien que les conditions élevées de glucose aient réduit dramatiquement les effets du VEGF sur les phénomènes angiogéniques étudiés, aucun effet additif de l'hypoxie ne fut observé. Nos résultats représentent cependant bien le désordre angiogénique retrouvé dans la MAP, lequel est responsable de la faible revascularisation en réponse à l'hypoxie.

La réduction des effets mitogéniques du VEGF sur les CEs montre une dérégulation de ces dernières en condition d'hyperglycémie contribuant au désordre angiogénique. Il y a actuellement très peu d'études *in vitro* publiées à ce jour en lien avec les effets mitogéniques du VEGF sur les CEs en condition élevée de glucose. Toutefois nos résultats corroborent plusieurs études susmentionnées dont celles de Bernatchez et al (1999) qui a démontré que le VEGF induit la prolifération et migration cellulaire en condition normale de glucose et d'oxygène chez des BAECs. Nos résultats corroborent aussi ceux de Geraldès et al (2007) et de Moriya et al (2015) qui ont montré une augmentation du nombre de tubules formés suite à une stimulation au VEGF en concentration normale de glucose dans des CEs et HUVECs, respectivement. Nos résultats confirment aussi ceux de Nakamura et al (2011) et Paquin-Veillet et al (2017) qui ont démontré une réduction des effets du VEGF en condition élevée de glucose au niveau de la prolifération des EPCs et BAECs, respectivement. Les groupes Chen et al (2007), Warren et al (2014) et Paquin-Veillet et al (2017) ont montré que les concentrations élevées de glucose réduisent la migration cellulaire induite par le VEGF dans les CEs, ce qui confirme nos résultats. De plus nos résultats *in vitro* obtenus pour la prolifération cellulaire (Figure 21), la migration cellulaire (Figure 22) et la formation de tubules (Figure 23) vont dans le même sens que les deux études *in vivo* publiées par Rivard et al (1999) et Lizotte et al (2013), lesquelles ont confirmé la réduction de la néovascularisation chez les souris diabétiques au niveau du muscle ischémique.

Effets de l'hyperglycémie et de l'hypoxie sur les voies de signalisation VEGF

Pour comprendre davantage la réduction des effets mitogéniques du VEGF, les voies de signalisation du VEGF ont été évaluées. Nos résultats ont montré que l'exposition des BAECs en condition élevée de glucose réduisait l'activation du VEGFR2 (Figure 24A). Nous avons démontré (Lizotte et al., 2013) une réduction de la phosphorylation du VEGFR2 dans le muscle ischémique des souris diabétiques par rapport aux souris non-diabétiques. Une autre étude *in vivo* (Warren et al., 2014) a montré une réduction de l'activation du VEGFR2 immunoprécipité à partir de poumons de souris ayant un diabète induit à la STZ et qui ont reçu une perfusion au VEGF. Le groupe de Warren et al (2014) s'est intéressé aux effets de concentrations élevées de glucose sur la phosphorylation du VEGFR2 en condition élevée de glucose. Des HUVECs ont été exposées en condition élevée de glucose (25 mM) pendant 5 jours et les effets du VEGF sur la phosphorylation de VEGFR2 étaient diminués (Warren et al., 2014). Les études de Lizotte et al (2013) et de Warren et al (2014) confirment nos résultats pour la phosphorylation de VEGFR2, bien que nos cellules aient été exposées pendant 24h aux concentrations élevées de glucose. Nous n'avons obtenu aucun résultat en hypoxie, puisque les membranes, lors de la révélation, avaient souvent une absence de bandes bien que les expérimentations aient été réalisées dans les mêmes conditions. D'autres expérimentations seront nécessaires afin de confirmer ce phénomène en hypoxie.

Tant en normoxie qu'en hypoxie, l'activation de p-Akt était significativement réduite chez les BAECs exposées en concentration élevée de glucose (Figure 24A et 24B). Nakamura et al (2011) a observé ce changement chez des EPCs qui ont été exposées pendant 72h à des concentrations élevées de glucose (20 mM) puis stimulées au VEGF 25 ng/ml pour une durée de 15 minutes. Les résultats de Nakamura et al (2011) ont montré une réduction significative des effets du VEGF sur l'activation de p-Akt en comparaison aux EPCs exposées en concentration normale de glucose. Malgré le protocole différent et le type cellulaire différent, les résultats de Nakamura et al (2011) corroborent les résultats que nous avons obtenus quant à la réduction de l'activation d'Akt suite à une suite à une stimulation au VEGF dans les BEAC exposées à des concentrations élevées de glucose et en normoxie. En effet, Nakamura et al (2011) ont utilisé des concentrations de glucose inférieures de 5 mM par rapport à ce que nous avons utilisé. Par ailleurs, ils ont exposé leurs cellules 48h de plus que nous avant d'évaluer la voie de signalisation du VEGF avec une dose

supérieure de 15 ng/ml par rapport à ce que nous avons utilisé et un temps de stimulation plus élevé de 5 minutes.

Une étude publiée par Paquin-Veillette et al (2017) a montré que les concentrations élevées de glucose altéraient significativement l'activation de p-VEGFR2 et de p-Akt induite par le VEGF dans les BAECs en normoxie. Ces expériences ont été effectuées dans les mêmes conditions que celles de la présente étude, confirmant nos résultats.

Nos résultats ont montré que les effets du VEGF étaient réduits significativement au niveau de l'activation de ERK tant en normoxie qu'en hypoxie (Figure 24C et 24D). Toutefois, nos résultats sont en désaccord avec une étude (Huang et Sheibani, 2008) qui a montré que l'hyperglycémie menait à l'activation de ERK dans les cellules endothéliales rétinienne. Il semblerait que les niveaux d'expression de ERK dans un contexte d'hyperglycémie soient dépendants du type cellulaire. Peu d'études *in vitro* ont été réalisées sur l'activation de ERK par le VEGF dans les CEs en milieu élevé de glucose. Tel que mentionné dans la section 1.8.1.2, la voie de ERK est impliquée dans la prolifération cellulaire. En effet, une fois activé, ERK migre au noyau et active la transcription de facteurs de transcription dont c-Jun et c-Fos (Hoeber et al., 2004). C-Fos et c-Jun forment avec le facteur activateur transcriptionnel (ATF), la protéine-1 activatrice (AP-1) (Shaulian et Karin, 2001). AP-1 est impliquée dans la progression du cycle cellulaire et donc dans la prolifération cellulaire (Shaulian et Karin, 2001). Il a été montré dans les HUVECs que le VEGF induisait l'expression d'AP-1 menant à leur prolifération (Jia et al., 2016). Ainsi, l'altération de la phosphorylation du récepteur au VEGF par SHP-1 réduirait l'activation de ERK, donc son effet sur AP-1 et ultimement la prolifération cellulaire. L'altération de l'activation de ERK en condition diabétique contribuerait au désordre angiogénique dans les CEs.

Nous avons donc montré, tant en normoxie qu'en hypoxie, que l'exposition des CEs à des concentrations élevées de glucose permettait de réduire significativement l'activation de VEGFR2, d'Akt et d'ERK induite par le VEGF. Il aurait été intéressant de mesurer d'autres médiateurs activés par le récepteur au VEGF puisque son activation implique une augmentation de l'activité d'Akt, d'ERK, de p38MAPK, de Rac, de FAK et de PLC γ 1 tel que l'illustre la figure 14. En effet, la réduction de l'activation d'Akt affecterait la survie cellulaire en raison de la diminution de

l'inhibition de BAD et de la caspase 9. La baisse de l'activation de PLC γ 1 réduirait l'activation d'ERK, altérant la prolifération cellulaire. Il est aussi possible de spéculer sur de possibles effets causés par l'hyperglycémie au niveau de p38MAPK, de RAK et de FAK puisque leurs effets dans les CE sont connus. La réduction de l'activation d'eNOS et de Rac pourrait affecter la perméabilité cellulaire et la migration cellulaire alors que la diminution de l'activation de p38MAPK mènerait à une réduction de la réorganisation du cytosquelette d'actine réduisant la migration cellulaire. La baisse de l'activation de FAK pourrait aussi réduire la migration cellulaire en raison de la diminution du «turnover» de l'adhésion focale. Il y a donc plusieurs médiateurs impliqués dans le processus angiogénique et il est possible qu'ils soient affectés par l'hyperglycémie, il aurait donc été intéressant de mesurer l'activité de p38MAPK, de Rac, de FAK et de PLC γ 1 dans nos conditions.

Nous avons posé l'hypothèse que l'hyperglycémie augmenterait l'activité et l'expression de SHP-1 menant à la réduction de l'activation du récepteur au VEGF contribuant à la réduction de l'angiogenèse. En effet, nos résultats démontrent de toute évidence, comme il sera discuté plus loin, l'implication de SHP-1 dans la dérégulation du processus angiogénique en hyperglycémie. Outre SHP-1, tel que discuté à la section 1.2, il y a plusieurs voies qui sont impliquées dans le désordre angiogénique notamment la voie des polyols, la voie des hexosamines, la voie des PKC, la voie des AGEs et l'augmentation du stress oxydatif (voir figure 1). De plus, tel que discuté à la section 1.7.3 (Figure 12), l'hyperglycémie affecterait la réponse cellulaire à l'hypoxie par des modifications de HIF-1 α contribuant à la réduction de la transcription gènes impliqués dans l'angiogenèse, notamment celui du VEGF. Les différentes voies (polyols, AGEs, PCK, hexosamines et celle des ROS) de même que l'altération de HIF-1 α sont sans aucun doute en partie responsables, avec SHP-1, de la réduction des effets du VEGF sur les phénomènes angiogéniques en raison de l'altération du fonctionnement cellulaire en condition élevée de glucose et d'hypoxie. Somme toute, il est possible d'affirmer que la dérégulation de la réponse angiogénique des CE en condition élevée de glucose observée dans notre étude serait responsable de l'altération de la formation de vaisseaux collatéraux en réponse à l'hypoxie en condition diabétique, une condition caractérisant la MAP.

Implication de SHP-1 dans la perte des effets angiogéniques du VEGF

Un mécanisme permettant d'expliquer la réduction de l'action des facteurs de croissance en condition diabétique est par l'action de la protéine tyrosine phosphatase SHP-1 tel que discuté à la section 1.9.1.1. Il a été montré que SHP-1 peut s'associer aux récepteurs de facteurs de croissance ayant une activité kinase intrinsèque. Cette interaction permettrait d'inhiber l'activation de ces récepteurs et par le fait même leurs protéines effectrices telles que Akt et ERK (Chong et Maiese, 2007). Ainsi, la PTP SHP-1 pourrait avoir un effet anti-mitogénique sur la signalisation en inactivant le VEGFR2 et ses protéines effectrices. Lors des essais de co-immunoprécipitations, nous avons montré une augmentation de l'interaction entre SHP-1 et VEGFR2 en condition élevée de glucose tant en normoxie qu'en hypoxie (voir Figure 25). Nous avons par la suite vérifié l'activité phosphatase de SHP-1 afin de voir si son activité était augmentée en milieu élevé de glucose en normoxie et en hypoxie. L'activité phosphatase de SHP-1 était augmentée lorsque les BAECs étaient exposées en milieu avec des concentrations élevées de glucose. Il est possible de constater que l'activité phosphatase de SHP-1 est plus faible en hypoxie qu'en normoxie (voir Figure 26). En effet, il a été démontré dans des CMLv que l'hypoxie mène à une réduction de l'activité des PTPs par un mécanisme encore mal compris dépendant de HIF-1 α (Freyhaus et al., 2011). Ainsi, il aurait été intéressant de vérifier dans notre modèle d'étude l'activité de HIF-1 α et son implication dans ces observations. Une étude publiée par Maulik et al (2008) confirme la baisse de l'activité phosphatase que nous avons observée en hypoxie. En effet, ils ont montré que l'hypoxie a mené à une baisse de l'activité des PTPs dans le cortex cérébral du fœtus du cochon d'inde (Maulik et al., 2008). Ces études corroborent notre étude quant à la baisse de l'activité phosphatase de SHP-1 dans les BAECs en hypoxie en comparaison aux cellules qui sont en normoxie. Une récente étude publiée par notre laboratoire confirme également que l'hyperglycémie augmente l'activité et l'interaction de SHP-1 avec VEGFR2 en condition élevée de glucose dans les BAECs en présence de niveaux normaux d'oxygène (Paquin-Veille et al., 2017).

En raison de ces résultats, nous avons évalué les niveaux d'expression de PTPs en protéine et en ARNm en normoxie et en hypoxie. Nous n'avons observé aucune variation de l'expression protéique de SHP-1, SHP-2 et PTP1B chez les BAECs exposées en conditions élevées de glucose par rapport aux cellules exposées en teneur normale de glucose (voir Figure 27). De plus, les

résultats de qPCR n'ont montré aucune variation de l'expression en ARNm de SHP-1, SHP-2, PTP1B et VE-PTP chez les BAECs exposées en teneur élevée de glucose en comparaison aux cellules exposées à des concentrations normales de glucose (voir Figure 28). Il a également été montré que les conditions élevées de glucose n'influencent pas les niveaux d'expression en protéine de SHP-1 et SHP-2 dans les BAECs en normoxie (Paquin-Veillette et al., 2017). L'expression de SHP-1, notre PTP d'intérêt, était augmentée dans le muscle ischémique de souris diabétiques (Lizotte et al., 2013). En raison de ces résultats, nous nous attendions à une augmentation de son expression. Puisqu'il s'agit d'un modèle animal, il se peut qu'un autre type cellulaire soit responsable de cette augmentation de l'expression de SHP-1 *in vivo*, notamment les CMLv ou les cellules musculaires striées squelettiques.

Nos résultats montrent donc que la régulation négative des voies de signalisation du VEGF ainsi que la perte des effets pro-angiogéniques du VEGF démontrée par les essais de prolifération, de migration et formation de tubules en condition élevée de glucose sont le résultat de l'augmentation de l'interaction de SHP-1 avec VEGFR2 de même que l'augmentation de l'activité phosphatase de SHP-1.

La surexpression d'une forme dominante-négative de SHP-1 permet de rétablir les effets mitogéniques du VEGF

Afin de confirmer l'implication de SHP-1 dans la perte des effets pro-angiogéniques du VEGF, nous avons surexprimé une forme dominante-négative de SHP-1 dans les BAECs. En effet, cette surexpression a permis de rétablir les effets mitogéniques du VEGF lorsque les BAECs étaient exposées en condition élevée de glucose au niveau de la prolifération cellulaire (voir Figure 29), de la migration cellulaire (voir Figure 30), de la formation de tubules (voir Figure 31) tant en normoxie qu'en hypoxie en comparaison aux cellules infectées avec l'adénovirus contrôle GFP. Ces résultats permettent d'affirmer l'implication de SHP-1 dans la perte des effets du VEGF sur l'angiogenèse en condition élevée de glucose. Une étude *in vivo* réalisée par Sugano et al (2007) a montré que l'injection d'un siRNA réduisant l'expression de SHP-1 a permis d'augmenter la phosphorylation de KDR/flk-1 et la densité de capillaire dans un modèle d'ischémie d'une patte chez le rat. Bien que cette étude n'était pas réalisée en condition diabétique, elle montre l'implication de SHP-1 dans la régulation négative de l'angiogenèse (Sugano et al., 2007). Une

étude *in vitro* réalisée par Cho et al (2008) dans des HUVECs a montré que l'ablation de SHP-1 par siRNA augmente significativement la formation de capillaires, la prolifération cellulaire et réduit l'apoptose en condition d'hypoxie (1% oxygène) en comparaison aux HUVECs contrôles (GFP siRNA). Les résultats de Cho et al (2008), bien que non générés en condition d'hyperglycémie, vont dans le même sens que ceux que nous avons obtenus par le fait que l'inhibition de l'action de SHP-1 endogène permet d'augmenter l'angiogenèse. La voie de l'Ang1 et de son récepteur Tie2 est aussi impliquée dans l'angiogenèse tel que discuté dans la section 1.6.4. Cette voie de signalisation est aussi altérée en condition diabétique. Il a été montré par Chen et al (2012) que l'ablation de SHP-1 avec un siRNA chez des *mouse heart microvascular endothelial cells* (MHMECs) exposées en conditions élevées de glucose (30 mM) a permis de prévenir l'activation de la caspase-3 induite par les conditions élevées de glucose et par le fait même de réduire l'apoptose des MHMECs. L'étude de Chen et al (2012) a aussi montré que l'inhibition des PTPs a permis d'augmenter la survie cellulaire induite par l'Ang1 en rétablissant la phosphorylation d'Akt et d'eNOS en condition élevée de glucose dans les MHMECs. De plus, l'utilisation d'inhibiteurs de PTPs a permis de rétablir l'angiogenèse induite par l'Ang1 dans des explants de vaisseaux extraits à partir de souris diabétiques (*db/db*). Par ailleurs, l'utilisation d'inhibiteurs de PTPs a permis d'atténuer l'expression de SHP-1 et d'augmenter l'expression d'eNOS de même que la densité en capillaires au niveau du myocarde chez les souris *db/db*. Ces résultats montrent l'implication de SHP-1 dans les complications vasculaires associées au diabète (Chen et al., 2012). Ainsi, les résultats de cette étude vont dans le même sens que notre étude par le fait que l'ablation de SHP-1 permettait de rétablir l'angiogenèse, mais au niveau d'une autre voie de signalisation cellulaire.

Nous avons ensuite étudié l'effet de la surexpression de la forme dominante-négative de SHP-1 sur les voies de signalisation du VEGF afin de valider que le rétablissement des effets mitogéniques du VEGF montrés aux Figures 29, 30 et 31 est en lien avec le rétablissement de l'activation d'Ak et d'ERK en teneur élevée de glucose. En effet, cette surexpression semble rétablir les effets du VEGF sur l'activation d'Akt (voir Figure 32A) et d'ERK (voir Figure 32B) en condition élevée de glucose. D'autres expérimentations seront nécessaires pour confirmer ces résultats en normoxie. De plus, il faudra effectuer ces expérimentations en hypoxie. Il a été montré que l'utilisation d'un siRNA SHP-1 a permis de rétablir les effets du VEGF sur l'activation de

VEGFR2, d'Akt et d'ERK dans des podocytes exposées en condition élevées de glucose (Mima et al., 2012). La surexpression d'une forme dominante-négative de SHP-1 a permis de rétablir la signalisation de l'insuline dans les podocytes exposés en conditions élevées de glucose et de prévenir leur apoptose (Drapeau et al., 2013). De plus, une forme dominante-négative de SHP-1 ou un siRNA ciblant SHP-1 a permis d'empêcher l'inhibition de la signalisation du PDGF dans les péricytes et de prévenir l'induction de l'apoptose (Geraldès et al., 2009). Ces différentes études montrent l'implication de SHP-1 dans la perte de la signalisation cellulaire au niveau de différents RTKs dans différents types cellulaires impliqués dans des pathologies vasculaires distinctes du diabète. Les résultats dans ces études soutiennent que l'inhibition de l'action endogène de SHP-1 par un siRNA ou une forme dominante-négative de SHP-1 permet de rétablir l'effets des facteurs de croissance au niveau de leurs voies de signalisation cellulaires respectives comme nos résultats préliminaires semblent démontrer au niveau des BAECs.

Perspectives

Il sera nécessaire de terminer les expérimentations portant sur la signalisation du VEGF en condition élevée de glucose en surexprimant la forme dominante-négative de SHP-1 en normoxie et en hypoxie. Afin de prouver le rôle important de SHP-1 au niveau des CEs et sur les processus angiogéniques à la suite d'une ischémie, notre laboratoire a généré une souris déficiente pour le gène de SHP-1 dans les CEs spécifiquement. Des souris ayant le transgène *Cdh5-rtTA* (spécifique aux CEs) et le transgène *tet-O-Cre* ont été croisé avec les souris SHP-1 flox (*Ptpn6^{flox/flox}*). Ces dernières possèdent les séquences LoxP de chaque côté de l'exon 1 et 9 de la séquence de SHP-1. Les séquences LoxP seront reconnues par la recombinaise Cre qui clivera ainsi le gène d'intérêt ce qui induira la délétion du gène de SHP-1. Afin de rendre cette délétion spécifique aux CEs et inductible, il est nécessaire d'utiliser deux systèmes de façon simultanée. En premier lieu, le système rtTa (activateur transcriptionnel inverse de la tTa) va induire la production de la protéine rtTa qui peut se lier au promoteur TetO (*tetracyclin-On*) et activer la transcription du gène de la recombinaise Cre seulement en présence de doxycycline. Afin que la délétion soit spécifique dans

les CEs, le gène codant pour la protéine rtTA est sous le contrôle du promoteur VE-Cadhérine (Cdh5) spécifique aux CEs (voir Figure 33).

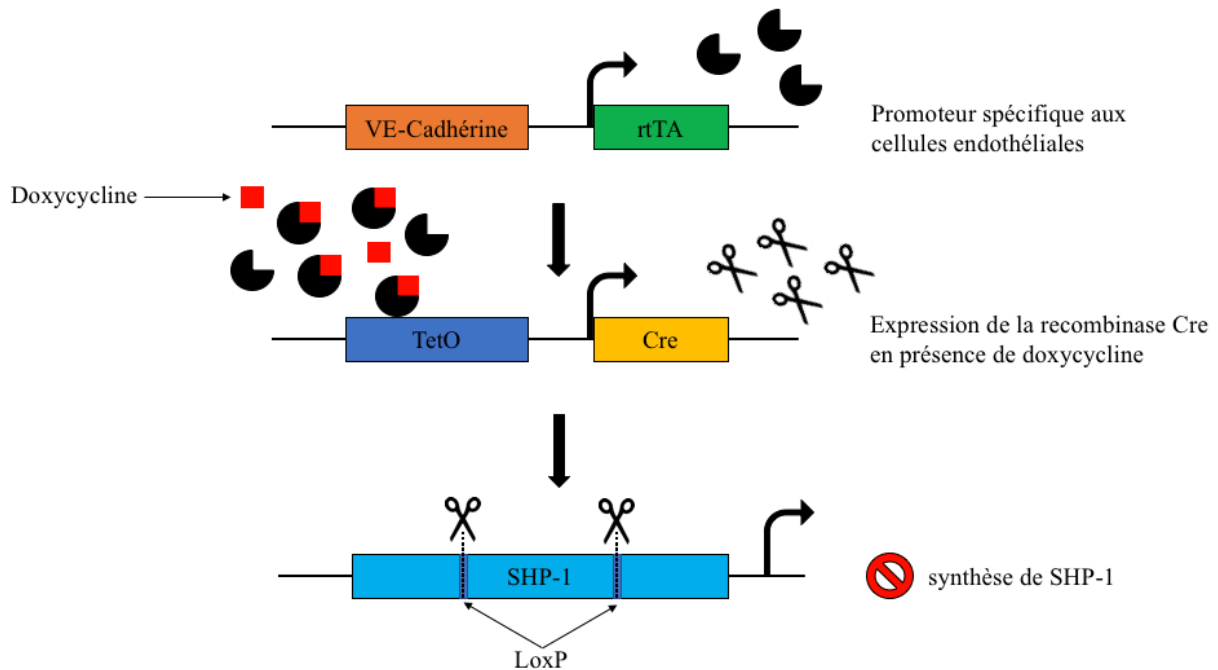


Figure 33 : Modèle de souris transgénique avec délétion de SHP-1 inducible et spécifique aux cellules endothéliales

Le transgène rtTA est sous le contrôle du promoteur VE-Cadhérine, qui est uniquement exprimé dans les cellules endothéliales vasculaires. En absence de doxycycline, la protéine rtTA est incapable de se lier au promoteur tetOn, qui est donc inactif. Avec l'ajout de doxycycline dans la nourriture des souris, il y aura liaison de cette dernière avec la protéine rtTA qui va pouvoir se lier au promoteur tetOn et ainsi activer la transcription de la recombinaase Cre. La recombinaase Cre va cliver les sites LoxP retrouvés entre les exons 1 et 9 de SHP-1 et ainsi empêcher la synthèse de la protéine.

Par la suite, les souris seront rendues diabétiques par injection à la streptozotocine. L'ajout de doxycycline dans la nourriture permettra la délétion de SHP-1 spécifiquement dans les CEs. La doxycycline sera introduite avant les injections de streptozotocine et après 2 mois de diabète, juste avant de faire la chirurgie. Afin de reproduire la maladie des artères périphériques, l'ischémie d'une patte inférieure sera provoquée par la ligature de l'artère fémorale, tandis que l'autre patte servira de contrôle non-ischémique. En premier lieu, il sera intéressant de mesurer la reperfusion sanguine avec un Doppler au laser en pré-chirurgie et post-chirurgie ainsi que pendant 4 semaines avec des mesures à hebdomadaires. Ensuite, il sera intéressant d'évaluer l'effet de l'ischémie sur l'expression des protéines de la voie du VEGF (PLC γ , PI3K, Akt, ERK, eNOS) par PCR

quantitative et immunobuvardage de type western. L'expression de facteurs angiogéniques, tels que VEGF, PDGF, Ang1/2, FGF, SDF-1 et l'expression des protéines phosphatases seront aussi vérifiées (SHP-1, SHP-2, PTP1B, VE-PTP). Finalement, des analyses histologiques nous permettront de quantifier la densité des nouveaux vaisseaux dans le muscle ischémié via un marquage des cellules musculaires lisses vasculaires (*alpha smooth muscle actin* : α SM-actine) et des cellules endothéliales (CD31). Si SHP-1 est bien responsable du développement de la MAP en condition diabétique, il devrait en effet y avoir une bonne revascularisation de la patte opérée chez les souris diabétiques ayant eu la délétion de SHP-1 spécifiquement dans les CE.

CONCLUSION

Dans cette étude, nous avons montré que l'exposition des cellules endothéliales à des niveaux élevés de glucose inhibe les effets angiogéniques du VEGF sur la prolifération cellulaire, la migration cellulaire et la formation de tubules tant en normoxie qu'en hypoxie. Cette réduction des effets mitogéniques du VEGF était accompagnée d'une réduction de la signalisation du VEGF en milieu avec des concentrations élevées de glucose. Nous avons montré une augmentation de l'activité phosphatase de SHP-1 et de l'interaction de SHP-1 avec le VEGFR2, deux phénomènes fort probablement responsables de la perte des effets du VEGF en condition élevée de glucose puisque l'expression de SHP-1 tant en protéines qu'en ARNm demeurait inchangée. Nous avons aussi confirmé le rôle de SHP-1 dans la perte des effets mitogéniques du VEGF en condition élevée de glucose. En effet, la surexpression d'une forme dominante-négative de SHP-1 a permis de rétablir les effets pro-angiogéniques du VEGF sur la prolifération cellulaire, la migration cellulaire et la formation de tubules en concentrations élevée de glucose tant en normoxie qu'en hypoxie. Nos résultats préliminaires démontrent aussi que cette surexpression tend à rétablir les voies de signalisation du VEGF en hyperglycémie. Beaucoup d'études devront être réalisées afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et potentiellement avoir une meilleure prise en charge des patients diabétiques atteints de MAP. En somme, cette étude a permis de caractériser le rôle de SHP-1 dans la MAP au niveau des cellules endothéliales et démontre que SHP-1 pourrait être une cible thérapeutique potentielle pour le traitement de la MAP.

LISTE DES RÉFÉRENCES

- Alitalo, K. et Carmeliet, P. (2002). Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease. *Cancer Cell*, 1(3), 219-227.
- Ambler, G. K., Radwan, R., Hayes, P. D. et Twine, C. P. (2014). Atherectomy for peripheral arterial disease. *The Cochrane database of systematic reviews*, 3, CD006680.
- Andrew, P. J. et Mayer, B. (1999). Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovascular Research*.
- Anik, A., Çatli, G., Abaci, A. et Böber, E. (2015). Maturity-onset diabetes of the young (MODY): An update. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, 28(3-4), 251-263.
- Arroyo, A. G. et Iruela-Arispe, M. L. (2010). Extracellular matrix, inflammation, and the angiogenic response. *Cardiovascular Research*, 86(2), 226-235.
- Ashrafpour, H., Huang, N., Neligan, P. C., Forrest, C. R., Addison, P. D., Moses, M. A., Levine, R. H., et al. (2003). Vasodilator effect and mechanism of action of vascular endothelial growth factor (VEGF) in skin vasculature. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol*, 8, 946-954.
- Association Canadienne du Diabète (2015). Rapport sur le diabète 2015. *Agir pour le changement, Toronto*(ACD; 2015).
- Atkinson, M. A. (2012). The pathogenesis and natural history of type 1 diabetes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(11).
- Atkinson, M. A., Eisenbarth, G. S. et Michels, A. W. (2014). Type 1 diabetes. *Lancet*, 383(9911), 69-82.
- Augustin, H. G., Young Koh, G., Thurston, G. et Alitalo, K. (2009). Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin–Tie system. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(3), 165-177.
- Bansal, V., Kalita, J. et Misra, U. K. (2006). Diabetic neuropathy. *Postgraduate Medical Journal*.
- Bao, P., Kodra, A., Tomic-Canic, M., Golinko, M. S., Ehrlich, H. P. et Brem, H. (2009). The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Wound Healing. *Journal of Surgical Research*, 153(2), 347-358.
- Battegay, E. J., Rupp, J., Iruela-Arispe, L., Sage, E. H. et Pech, M. (1994). PDGF-BB modulates endothelial proliferation and angiogenesis in vitro via PDGF β -receptors. *Journal of Cell Biology*, 125(4), 917-928.
- Bäumer, S., Keller, L., Holtmann, A., Funke, R., August, B., Gamp, A., Wolburg, H., et al. (2006). Vascular endothelial cell-specific phosphotyrosine phosphatase (VE-PTP) activity is required for blood vessel development. *Blood*, 107(12), 4754-4762.
- Baumgartner, I., Pieczek, A., Manor, O., Blair, R., Kearney, M., Walsh, K. et Isner, J. M. (1998). Constitutive Expression of phVEGF165 After Intramuscular Gene Transfer Promotes Collateral Vessel Development in Patients With Critical Limb Ischemia. *Circulation*, 97(12), 1114-1123.
- Baz, B., Riveline, J. P. et Gautier, J. F. (2016). Gestational diabetes mellitus: Definition, aetiological and clinical aspects. *European Journal of Endocrinology*, 174(2), R43-R51.
- Bento, C. F., Fernandes, R., Matafome, P., Sena, C., Seia, R. et Pereira, P. (2010). Methylglyoxal-induced imbalance in the ratio of vascular endothelial growth factor to angiopoietin 2 secreted by retinal pigment epithelial cells leads to endothelial dysfunction. *Experimental Physiology*, 95(9), 955-970.

- Bento, C. F., Fernandes, R., Ramalho, J., Marques, C., Shang, F., Taylor, A. et Pereira, P. (2010). The chaperone-dependent ubiquitin ligase CHIP targets HIF-1 α for degradation in the presence of methylglyoxal. *PLoS ONE*, 5(11).
- Bento, C. F. et Pereira, P. (2011). Regulation of hypoxia-inducible factor 1 and the loss of the cellular response to hypoxia in diabetes. *Diabetologia*, 54(8), 1946-1956.
- Berliner, J. A., Navab, M., Fogelman, A. M., Frank, J. S., Demer, L. L., Edwards, P. A., Watson, A. D., et al. (1995). Atherosclerosis: Basic mechanisms: Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation*.
- Bhattacharya, R., Kwon, J., Wang, E., Mukherjee, P. et Mukhopadhyay, D. (2008). Src homology 2 (SH2) domain containing protein tyrosine phosphatase-1 (SHP-1) dephosphorylates VEGF Receptor-2 and attenuates endothelial DNA synthesis, but not migration. *Journal of Molecular Signaling*, 3.
- Bitterli, L., Afan, S., Bühler, S., DiSanto, S., Zwahlen, M., Schmidlin, K., Yang, Z., et al. (2016). Endothelial progenitor cells as a biological marker of peripheral artery disease. *Vascular Medicine*, 21(1), 3-11.
- Blanco, R. et Gerhardt, H. (2013). VEGF and Notch in tip and stalk cell selection. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 3(1), 1-19.
- Blasi, F. et Carmeliet, P. (2002). uPAR: A versatile signalling orchestrator. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*.
- Bloor, C. M. (2005). Angiogenesis during exercise and training. *Angiogenesis*, 8(3), 263-271.
- Booth, G., Lipscombe, L., Butalia, S., Dasgupta, K., Eurich, D., Goldenberg, R., Khan, N., et al. (2016). Pharmacologic Management of Type 2 Diabetes: 2016 Interim Update. *Canadian Journal of Diabetes*, 40(6), 484-486.
- Botusan, I. R., Sunkari, V. G., Savu, O., Catrina, A. I., Grunler, J., Lindberg, S., Pereira, T., et al. (2008). Stabilization of HIF-1 is critical to improve wound healing in diabetic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(49), 19426-19431.
- Boulton, A., Vileikyte, L., Ragnarson-Tennvall, G. et Apelqvist, J. (2005). The global burden of diabetic foot disease. *Lancet*, 366, 1719-1724.
- Breier, G. (2000). Angiogenesis in embryonic development--a review. *Placenta*, 21 Suppl A, S11-S15.
- Brissova, M., Fowler, M. J., Nicholson, W. E., Chu, A., Hirshberg, B., Harlan, D. M. et Powers, A. C. (2005). Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. *J Histochem Cytochem*, 53(9), 1087-1097.
- Broermann, A., Winderlich, M., Block, H., Frye, M., Rossaint, J., Zarbock, A., Cagna, G., et al. (2011). Dissociation of VE-PTP from VE-cadherin is required for leukocyte extravasation and for VEGF-induced vascular permeability in vivo. *The Journal of Experimental Medicine*, 208(12), 2393-2401.
- Brownlee, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 414(6865), 813-820.
- Bussolino, F., Mantovani, A. et Persico, G. (1997). Molecular mechanisms of blood vessel formation. *Trends in Biochemical Science*, 22(7), 251-256.
- Canadian diabetes association (2017). Diabetes Canada.
- Carmeliet, P. (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nature Medicine*.
- Carmeliet, P. (2005). Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*.
- Catrina, S., Okamoto, K., Pereira, T., Brismar, K. et Poellinger, L. (2004). Protein Stability and Function. *The American Diabetes Association*, 53(December), 3226-3232.

- Ceradini, D. J. et Gurtner, G. C. (2005). Homing to hypoxia: HIF-1 as a mediator of progenitor cell recruitment to injured tissue. *Trends in Cardiovascular Medicine*.
- Ceradini, D. J., Kulkarni, A. R., Callaghan, M. J., Tepper, O. M., Bastidas, N., Kleinman, M. E., Capla, J. M., et al. (2004). Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nature Medicine*, 10(8), 858-864.
- Ceradini, D. J., Yao, D., Grogan, R. H., Callaghan, M. J., Edelstein, D., Brownlee, M. et Gurtner, G. C. (2008). Decreasing intracellular superoxide corrects defective ischemia-induced new vessel formation in diabetic mice. *Journal of Biological Chemistry*, 283(16), 10930-10938.
- Chen, J. X. et Stinnett, A. (2008). Disruption of Ang-1/Tie-2 signaling contributes to the impaired myocardial vascular maturation and angiogenesis in type II diabetic mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 28(9), 1606-1613.
- Chen, J. X., Tuo, Q., Liao, D. F. et Zeng, H. (2012). Inhibition of protein tyrosine phosphatase improves angiogenesis via enhancing Ang-1/Tie-2 signaling in diabetes. *Experimental Diabetes Research*, 2012.
- Chen, Y., Lin, S., Lin, F., Wu, T. et Tsao, C. (2007). High Glucose Impairs Early and Late Endothelial Progenitor Cells by Modifying Nitric Oxide – Related but Not Oxidative Stress – Mediated Mechanisms. *Diabetes*, 56(June), 1559-1568.
- Cho, S. W., Hartle, L., Son, S. M., Yang, F., Goldberg, M., Xu, Q., Langer, R., et al. (2008). Delivery of small interfering RNA for inhibition of endothelial cell apoptosis by hypoxia and serum deprivation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 376(1), 158-163.
- Chong, Z. Z. et Maiese, K. (2007). The Src homology 2 domain tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2 : diversified control of cell growth , inflammation , and injury Histology and, 2, 1251-1267.
- Chowdhury Mohammed, M., McLain Alexander, D. et Twine Christopher, P. (2014). Angioplasty versus bare metal stenting for superficial femoral artery lesions. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (6).
- Chung, A. S. et Ferrara, N. (2011). Developmental and Pathological Angiogenesis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 27(1), 563-584.
- Cinamon, G., Shinder, V. et Alon, R. (2001). Shear forces promote lymphocyte migration across vascular endothelium bearing apical chemokines. *Nature Immunology*, 2(6), 515-522.
- Clapp, C., Thebault, S., Jeziorski, M. C. et Martinez De La Escalera, G. (2009). Peptide Hormone Regulation of Angiogenesis. *Physiological reviews*, 89(4), 1177-1215.
- Conte, M. S., Pomposelli, F. B., Clair, D. G., Geraghty, P. J., McKinsey, J. F., Mills, J. L., Moneta, G. L., et al. (2015). Society for Vascular Surgery practice guidelines for atherosclerotic occlusive disease of the lower extremities: Management of asymptomatic disease and claudication. *Journal of Vascular Surgery*, 61(3), 2S-41S.
- Conway, E. M., Collen, D. et Carmeliet, P. (2001). Molecular mechanisms of blood vessel formation. *Cardiovascular Research*, 49(May), 507-521.
- Cooper, L. T. J., Hiatt, W. R., Creager, M. A., Regensteiner, J. G., Casscells, W., Isner, J. M., Cooke, J. P., et al. (2001). Proteinuria in a placebo-controlled study of basic fibroblast growth factor for intermittent claudication. *Vascular medicine (London, England)*, 6(4), 235-239.
- Corti, F. et Simons, M. (2017). Modulation of VEGF receptor 2 signaling by protein phosphatases. *Pharmacological Research*, 115, 107-123.
- Cosentino, F., Eto, M., Paolis, P. De, Loo, B. van der, Bachschmid, M., Ullrich, V., Kouroedov,

- A., et al. (2003). High Glucose Causes Upregulation of Cyclooxygenase-2 and Alters Prostanoid Profile in Human Endothelial Cells Role of Protein Kinase C and Reactive Oxygen Species. *Circulation*, 107(7), 1017-1023.
- Creager, M. A., Olin, J. W., Belch, J. J. F., Moneta, G. L., Henry, T. D., Rajagopalan, S., Annex, B. H., et al. (2011). Effect of hypoxia-inducible factor-1 α gene therapy on walking performance in patients with intermittent claudication. *Circulation*, 124(16), 1765-1773.
- Criqui, M. et Aboyans, V. (2015). Epidemiology of peripheral artery disease. *Circulation research*, 116(9), 1509-26.
- Criqui, M. H. (2001). Peripheral arterial disease--epidemiological aspects. *Vascular medicine*, 6(3 Suppl), 3-7.
- Curcio, F. et Ceriello, A. (1992). Decreased cultured endothelial cell proliferation in high glucose medium is reversed by antioxidants: New insights on the pathophysiological mechanisms of diabetic vascular complications. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, 28(11-12), 787-790.
- Davenport, A. P., Hyndman, K. A., Dhaun, N., Southan, C., Kohan, D. E., Pollock, J. S. et Pollock, D. M. (2016). Endothelin. *Pharmacological reviews*, 95499.
- Dayan, F., Mazure, N., Brahimi-Horn, M. et Pouyssegur, J. (2008). A dialogue between the hypoxia-inducible factor and the tumor microenvironment. *Cancer microenviron.*, 1(1), 53-68.
- De Falco, E., Avitabile, D., Totta, P., Straino, S., Spallotta, F., Cencioni, C., Torella, A. R., et al. (2009). Altered SDF-1-mediated differentiation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells in diabetes mellitus. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13(9 B), 3405-3414.
- DeFronzo, R. A. (2004). Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Medical Clinics of North America*, 88(4), 787-835.
- Deshpande, A. D. et Harris-hayes, M. (2008). Diabetes Special Issue Diabetes-Related Complications. *The American Physical Therapy Association*, 88, 1254-1264.
- Diabète Québec (2018). La neuropathie.
- Ding, Y., Vaziri, N. D., Coulson, R., Kamanna, V. S. et Roh, D. D. (2000). Effects of simulated hyperglycemia, insulin, and glucagon on endothelial nitric oxide synthase expression. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 279(1), E11-E17.
- Dominguez, M. G., Hughes, V. C., Pan, L., Simmons, M., Daly, C., Anderson, K., Noguera-Troise, I., et al. (2007). Vascular endothelial tyrosine phosphatase (VE-PTP)-null mice undergo vasculogenesis but die embryonically because of defects in angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(9), 3243-3248.
- Drapeau, N., Lizotte, F., Denhez, B., Guay, A., Kennedy, C. R. et Gervais, P. (2013). Expression of SHP-1 induced by hyperglycemia prevents insulin actions in podocytes. *AJP: Endocrinology and Metabolism*, 304(11), E1188-E1198.
- Du, X.-L., Edelstein, D., Rossetti, L., Fantus, I. G., Goldberg, H., Ziyadeh, F., Wu, J., et al. (2000). Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(22), 12222-12226.
- Du, X. L., Edelstein, D., Dimmeler, S., Ju, Q., Sui, C. et Brownlee, M. (2001). Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. *The Journal of clinical investigation*, 108(9), 1341-1348.

- Dua, A. et Lee, C. J. (2016). Epidemiology of Peripheral Arterial Disease and Critical Limb Ischemia. *Techniques in Vascular and Interventional Radiology*.
- Duckworth, W. C., Bennett, R. G. et Hamel, F. G. (1998). Insulin degradation: Progress and potential. *Endocrine Reviews*.
- Duh, E. J., Sun, J. K. et Stitt, A. W. (2017). Diabetic retinopathy: current understanding, mechanisms, and treatment strategies. *JCI Insight*, 2(14), 1-13.
- Dumont, D. J., Gradwohl, G., Fong, G. H., Puri, M. C., Gertsenstein, M., Auerbach, A. et Breitman, M. L. (1994). Dominant-negative and targeted null mutations in the endothelial receptor tyrosine kinase, tek, reveal a critical role in vasculogenesis of the embryo. *Genes and Development*, 8(16), 1897-1909.
- Durpès, M. C., Morin, C., Paquin-Veillet, J., Beland, R., Paré, M., Guimond, M. O., Rekhter, M., et al. (2015). PKC- β activation inhibits IL-18-binding protein causing endothelial dysfunction and diabetic atherosclerosis. *Cardiovascular Research*, 106(2), 303-313.
- Dustin, L. B., Plas, D. R., Wong, J., Hu, Y. T., Soto, C., Chan, A. C. et Thomas, M. L. (1999). Expression of dominant-negative src-homology domain 2-containing protein tyrosine phosphatase-1 results in increased Syk tyrosine kinase activity and B cell activation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 162(5), 2717-24.
- Dyck, P. J., Kratz, K. M., Karnes, J. L., Litchy, W. J., Klein, R., Pach, J. M., Wilson, D. M., et al. (1993). The prevalence by staged severity of various types of diabetic neuropathy, retinopathy, and nephropathy in a population-based cohort: The Rochester Diabetic Neuropathy Study. *Neurology*, 43(4), 817-817.
- Eichmann, A. et Simons, M. (2012). VEGF signaling inside vascular endothelial cells and beyond. *Current Opinion in Cell Biology*, 24(2), 188-193.
- Eklund, L., Kangas, J. et Saharinen, P. (2016). Angiopoietin-Tie signalling in the cardiovascular and lymphatic systems. *Clinical Science*, 131(1), 87-103.
- Elchebly, M., Payette, P., Michaliszyn, E., Cromlish, W., Collins, S., Loy, A. L., Normandin, D., et al. (1999). Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science*, 283(5407), 1544-1548.
- Eshaq, R. S., Aldalati, A. M. Z., Alexander, J. S. et Harris, N. R. (2017). Diabetic Retinopathy : Breaking the Barrier Diabetic retinopathy : Breaking the barrier. *Pathophysiology*, 24(August), 229-241.
- Fachinger, G., Deutsch, U. et Risau, W. (1999). Functional interaction of vascular endothelial-protein-tyrosine phosphatase with the Angiopoietin receptor Tie-2. *Oncogene*, 18(43), 5948-5953.
- Fagiani, E. et Christofori, G. (2013). Angiopoietins in angiogenesis. *Cancer Letters*, 328(1), 18-26.
- Fajans, S. S. et Brown, M. B. (1993). Administration of sulfonylureas can increase glucose-induced insulin secretion for decades in patients with maturity-onset diabetes of the young. *Diabetes Care*, 16(9), 1254-1261.
- Fishbein, M. C. (2010). The vulnerable and unstable atherosclerotic plaque. *Cardiovascular Pathology*, 19(1), 6-11.
- Freyhaus, H. Ten, Dagnell, M., Leuchs, M., Vantler, M., Berghausen, E. M., Caglayan, E., Weissmann, N., et al. (2011). Hypoxia enhances platelet-derived growth factor signaling in the pulmonary vasculature by down-regulation of protein tyrosine phosphatases. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 183(8), 1092-1102.
- Gadad, P. C., Matthews, K. H. et Knott, R. M. (2013). Role of HIF1 α and PKC β in mediating the

- effect of oxygen and glucose in a novel wound assay. *Microvascular Research*, 88, 61-69.
- Geraldes, P., Gosselin, H., Tanguay, J. F., Clément, R. et Calderone, A. (2007). Tamoxifen treatment of myocardial infarcted female rats exacerbates scar formation. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 454(3), 385-393.
- Geraldes, P., Hiraoka-Yamamoto, J., Matsumoto, M., Clermont, A., Leitges, M., Marette, A., Aiello, L. P., et al. (2009). Activation of PKC-delta and SHP-1 by hyperglycemia causes vascular cell apoptosis and diabetic retinopathy. *Nature Medicine*, 15(11), 1298-1306.
- Geraldes, P. et King, G. L. (2010). Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications. *Circulation Research*, 106(8), 1319-1331.
- Giacco, F. et Brownlee, M. (2010). Oxidative stress and diabetic complications. *Circulation Research*, 107(9), 1058-1070.
- Gill, M., Dias, S., Hattori, K., Rivera, M. L., Hicklin, D., Witte, L., Girardi, L., et al. (2001). Vascular Trauma Induces Rapid but Transient Mobilization of VEGFR2+AC133+ Endothelial Precursor Cells. *Circulation Research*, 88(2), 167-174.
- Gilroy, A. M., Macpherson, B. R., Ross, L. M., Voll, M. et Behets, C. (2010). Atlas d'anatomie. (Maloine, Dir.). Paris.
- Göke, B. (2008). Islet cell function: alpha and beta cells--partners towards normoglycaemia. *International journal of clinical practice. Supplement*, (159), 2-7.
- Goldenberg, R. et Punthakee, Z. (2013). Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes, Prediabetes and Metabolic Syndrome. *Canadian Journal of Diabetes*, 37(SUPPL.1), 8-11.
- Goldin, A., Beckman, J. A., Schmidt, A. M. et Creager, M. A. (2006). Advanced glycation end products: Sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation*, 114(6), 597-605.
- Gridley, T. (2007). Notch signaling in vascular development and physiology. *Development*, 134(15), 2709-2718.
- Grinnell, K. L., Casserly, B. et Harrington, E. O. (2010). Role of protein tyrosine phosphatase SHP2 in barrier function of pulmonary endothelium. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 298, L361-L370.
- Grochot-Przeczek, A., Dulak, J. et Jozkowicz, A. (2013). Therapeutic angiogenesis for revascularization in peripheral artery disease. *Gene*, 525(2), 220-228.
- Groothuis, P. G. (2005). Angiogenesis and vascular remodelling in female reproductive organs. *Angiogenesis*, 8(2), 87-88.
- Gunton, J. E., Kulkarni, R. N., Yim, S. H., Okada, T., Hawthorne, W. J., Tseng, Y. H., Roberson, R. S., et al. (2005). Loss of ARNT/HIF1 β mediates altered gene expression and pancreatic-islet dysfunction in human type 2 diabetes. *Cell*, 122(3), 337-349.
- Ha, C. H., Bennett, A. M. et Jin, Z.-G. (2008). A novel role of vascular endothelial cadherin in modulating c-Src activation and downstream signaling of vascular endothelial growth factor. *The Journal of biological chemistry*, 283(11), 7261-7270.
- Hakak, Y., Hsu, Y. S. et Martin, G. S. (2000). Shp-2 mediates v-Src-induced morphological changes and activation of the anti-apoptotic protein kinase Akt. *Oncogene*, 19(28), 3164-3171.
- Hammes, H.-P. (2005). Pericytes and the Pathogenesis of Diabetic Retinopathy. *Hormone and Metabolic Research*, 37, 39-43.
- Hanahan, D. (1997). Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science*.
- Harja, E., Chang, J. S., Lu, Y., Leitges, M., Zou, Y. S., Schmidt, A. M. et Yan, S.-F. (2009). Mice deficient in PKC β and apolipoprotein E display decreased atherosclerosis. *The*

- FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 23(4), 1081-1091.
- Hatanaka, K., Lanahan, A. A., Murakami, M. et Simons, M. (2012). Fibroblast growth factor signaling potentiates VE-cadherin stability at adherens junctions by regulating SHP2. *PLoS ONE*, 7(5).
- Hauge-Evans, A. C., King, A. J., Carmignac, D., Richardson, C. C., Robinson, I. C. A. F., Low, M. J., Christie, M. R., et al. (2009). Somatostatin secreted by islet delta-cells fulfills multiple roles as a paracrine regulator of islet function. *Diabetes*, 58(2), 403-11.
- Hayashi, M., Majumdar, A., Li, X., Adler, J., Sun, Z., Vertuani, S., Hellberg, C., et al. (2013). VE-PTP regulates VEGFR2 activity in stalk cells to establish endothelial cell polarity and lumen formation. *Nature Communications*, 4, 1615-1672.
- Hazarika, S., Dokun, A. O., Li, Y., Popel, A. S., Kontos, C. D. et Annex, B. H. (2007). Impaired angiogenesis after hindlimb ischemia in type 2 diabetes mellitus: Differential regulation of vascular endothelial growth factor receptor 1 and soluble vascular endothelial growth factor receptor 1. *Circulation Research*, 101(9), 948-956.
- He, R., Yu, Z., Zhang, R. et Zhang, Z. (2014). Protein tyrosine phosphatases as potential therapeutic targets. *Acta Pharmacologica Sinica*, 35(10), 1227-1246.
- Henquin, J. C. (2000). Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes*, 49(11), 1751-1760.
- Hoeben, A. N. N., Landuyt, B., Highley, M. S. M., Wildiers, H., Oosterom, A. T. V. A. N., Bruijn, E. A. D. E., Van Oosterom, A. T., et al. (2004). Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacological reviews*, 56(4), 549-580.
- Huang, H., Bhat, A., Woodnutt, G. et Lappe, R. (2010). Targeting the ANGPT-TIE2 pathway in malignancy. *Nature Reviews Cancer*.
- Huang, Q. et Sheibani, N. (2008). High glucose promotes retinal endothelial cell migration through activation of Src, PI3K / Akt1 / eNOS, and ERKs. *Cell*, 133(6), 1647-1657.
- Inoguchi, T., Battan, R., Handler, E., Sportsman, J. R., Heath, W. et King, G. L. (1992). Preferential elevation of protein kinase C isoform beta II and diacylglycerol levels in the aorta and heart of diabetic rats: differential reversibility to glycemic control by islet cell transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(22), 11059-11063.
- Inoguchi, T., Ueda, F., Umeda, F., Yamashita, T. et Nawata, H. (1995). Inhibition of intercellular communication via gap junction in cultured aortic endothelial cells by elevated glucose and phorbol ester. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 208(2), 492-497.
- Iqbal, Z., Azmi, S., Yadav, R., Ferdousi, M., Kumar, M., Cuthbertson, D. J., Lim, J., et al. (2018). Diabetic Peripheral Neuropathy: Epidemiology, Diagnosis, and Pharmacotherapy. *Clinical Therapeutics*, 1-22.
- Isner, J. M., Baumgartner, I., Rauh, G., Schainfeld, R., Blair, R., Manor, O., Razvi, S., et al. (1998). Treatment of thromboangiitis obliterans (Buerger's disease) by intramuscular gene transfer of vascular endothelial growth factor: Preliminary clinical results. *Journal of Vascular Surgery*, 28(6), 964-975.
- Isner, J. M., Pieczek, A., Schainfeld, R., Blair, R., Haley, L., Asahara, T., Rosenfield, K., et al. (1996). Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with ischaemic limb. *Lancet*, 348(9024), 370-374.
- Jacob, J., Chopra, S. et Baby, C. (2011). Neuro-endocrine regulation of blood pressure. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, 15(8), 281.
- Jain, R. K. (2003). Molecular regulation of vessel maturation. *Nature Medicine*, 9(6), 685-693.

- Jia, J., Ye, T., Cui, P., Hua, Q., Zeng, H. et Zhao, D. (2016). AP-1 transcription factor mediates VEGF-induced endothelial cell migration and proliferation. *Microvascular Research*, 105, 103-108.
- Jones, N., Chen, S. H. S., Sturk, C., Master, Z., Tran, J., Kerbel, R. S. et Dumont, D. J. (2003). A unique autophosphorylation site on Tie2/Tek mediates Dok-R phosphotyrosine binding domain binding and function. *Molecular and cellular biology*, 23(8), 2658-68.
- Jones, N., Master, Z., Jones, J., Bouchard, D., Gunji, Y., Sasaki, H., Daly, R., et al. (1999). Identification of Tek/Tie2 binding partners. Binding to a multifunctional docking site mediates cell survival and migration. *Journal of Biological Chemistry*, 274(43), 30896-30905.
- Kahn, S. E., Cooper, M. E. et Del Prato, S. (2014). Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: Perspectives on the past, present, and future. *The Lancet*.
- Kappert, K., Peters, K. G., Böhmer, F. D. et Östman, A. (2005). Tyrosine phosphatases in vessel wall signaling. *Cardiovascular Research*, 65(3), 587-598.
- Kassmeyer, S., Plendl, J., Custodis, P. et Bahramsoltani, M. (2009). New insights in vascular development: vasculogenesis and endothelial progenitor cells. *Anat Histol Embryol*, 38(1), 1-11.
- Katavetin, P. (2006). High Glucose Blunts Vascular Endothelial Growth Factor Response to Hypoxia via the Oxidative Stress-Regulated Hypoxia-Inducible Factor/Hypoxia-Responsible Element Pathway. *Journal of the American Society of Nephrology*, 17(5), 1405-1413.
- Katsuura, G., Asakawa, A. et Inui, A. (2002). Roles of pancreatic polypeptide in regulation of food intake. *Peptides*, 23(2), 323-329.
- Kavvoura, F. et Owen, K. (2011). Maturity onset diabetes of the young: clinical characteristics, diagnosis and management. *Pediatric endocrinology reviews: PER*, 10(2), 234-42.
- Khan, M. I., Pichna, B. a, Shi, Y., Bowes, A. J. et Werstuck, G. H. (2009). Evidence supporting a role for endoplasmic reticulum stress in the development of atherosclerosis in a hyperglycaemic mouse model. *Antioxidants & redox signaling*, 11(9), 2289-98.
- Klaman, L. D., Boss, O., Peroni, O. D., Kim, J. K., Martino, J. L., Zabolotny, J. M., Moghal, N., et al. (2000). Increased Energy Expenditure, Decreased Adiposity, and Tissue-Specific Insulin Sensitivity in Protein-Tyrosine Phosphatase 1B-Deficient Mice. *Molecular and Cellular Biology*, 20(15), 5479-5489.
- Knip, M., Veijola, R., Virtanen, S. M., Hyöty, H., Vaarala, O. et Åkerblom, H. K. (2005). Environmental triggers and determinants of type 1 diabetes. *Diabetes*, 54(SUPPL. 2).
- Kong, L., Shen, X., Lin, L., Leitges, M., Rosario, R., Zou, Y. S. et Yan, S. F. (2013). PKC β promotes vascular inflammation and acceleration of atherosclerosis in diabetic ApoE null mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 33(8), 1779-1787.
- Kroll, J. et Waltenberger, J. (1997). The vascular endothelial growth factor receptor KDR activates multiple signal transduction pathways in porcine aortic endothelial cells. *The Journal of biological chemistry*, 272(51), 32521-32527.
- Kusumanto, Y. H., van Weel, V., Mulder, N. H., Smit, A. J., van den Dungen, J. J. A. M., Hooymans, J. M. M., Sluiter, W. J., et al. (2006). Treatment with intramuscular vascular endothelial growth factor gene compared with placebo for patients with diabetes mellitus and critical limb ischemia: a double-blind randomized trial. *Human gene therapy*, 17(6), 683-91.
- Lacomis, D. (2002). Small-fiber neuropathy. *Muscle and Nerve*.

- Lanahan, A. A., Lech, D., Dubrac, A., Zhang, J., Zhuang, Z. W., Eichmann, A. et Simons, M. (2014). PTP1b is a physiologic regulator of vascular endothelial growth factor signaling in endothelial cells. *Circulation*, 130(11), 902-909.
- Laramé, M., Chabot, C., Cloutier, M., Stenne, R., Holgado-Madruga, M., Wong, A. J. et Royal, I. (2007). The scaffolding adapter Gab1 mediates vascular endothelial growth factor signaling and is required for endothelial cell migration and capillary formation. *Journal of Biological Chemistry*, 282(11), 7758-7769.
- Lazarous, D. F., Unger, E. F., Epstein, S. E., Stine, A., Arevalo, J. L., Chew, E. Y. et Quyyumi, A. A. (2000). Basic fibroblast growth factor in patients with intermittent claudication: Results of a phase I trial. *Journal of the American College of Cardiology*, 36(4), 1239-1244.
- Lederman, R. J., Mendelsohn, F. O., Anderson, R. D., Saucedo, J. F., Tenaglia, A. N., Hermiller, J. B., Hillegass, W. B., et al. (2002). Therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor-2 for intermittent claudication (the TRAFFIC study): a randomised trial. *Lancet*, 359(9323), 2053-2058.
- Levéen, P., Pekny, M., Gebre-Medhin, S., Swolin, B., Larsson, E. et Betsholtz, C. (1994). Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities. *Genes and Development*, 8(16), 1875-1887.
- Li, J. (2013). Selective inhibition of PKC β 2 preserves cardiac function after myocardial infarction and is associated with improved angiogenesis of ischemic myocardium in diabetic rats. *International Journal of Molecular Medicine*, 1037-1046.
- Li, X., Lee, C., Tang, Z., Zhang, F., Arjunan, P., Li, Y., Hou, X., et al. (2009). VEGF-B, 3(4), 322-327.
- Liao, S., Luo, C., Cao, B., Hu, H., Wang, S., Yue, H., Chen, L., et al. (2017). Endothelial Progenitor Cells for Ischemic Stroke: Update on Basic Research and Application. *Stem Cells International*, 2017.
- Lichtenberger, B. M., Tan, P. K., Niederleithner, H., Ferrara, N., Petzelbauer, P. et Sibilio, M. (2010). Autocrine VEGF Signaling Synergizes with EGFR in Tumor Cells to Promote Epithelial Cancer Development. *Cell*, 140(2), 268-279.
- Liu, L., Marti, G. P., Wei, X., Zhang, X., Zhang, H., Liu, Y. V., Nastai, M., et al. (2008). Age-dependent impairment of HIF-1 α expression in diabetic mice: Correction with electroporation-facilitated gene therapy increases wound healing, angiogenesis, and circulating angiogenic cells. *Journal of Cellular Physiology*, 217(2), 319-327.
- Lizotte, F., Paré, M., Denhez, B., Leitges, M., Guay, A. et Gervais, P. (2013). PKC δ impaired vessel formation and angiogenic factor expression in diabetic ischemic limbs. *Diabetes*, 62(8), 2948-2957.
- Lorenz, U. (2009). SHP-1 and SHP-2 in T cells: Two phosphatases functioning at many levels. *Immunological Reviews*, 228(1), 342-359.
- Lorenz, U., Ravichandran, K. S., Pei, D., Walsh, C. T., Burakoff, S. J. et Neel, B. G. (1994). Lck-Dependent Tyrosyl Phosphorylation of the Phosphotyrosine Phosphatase SH-PTP1 in Murine T Cells. *Molecular and Cellular Biology*, 14(3), 1824-1834.
- Lovell, M., Dickson, C. et Lindsay, T. F. (2015). Peripheral Artery Disease: The Unknown Cardiovascular Risk. *Diabetic Foot Canada*, 3(2), 6-9.
- Mace, K. A., Yu, D. H., Paydar, K. Z., Boudreau, N. et Young, D. M. (2007). Sustained expression of Hif-1 α in the diabetic environment promotes angiogenesis and cutaneous wound repair. *Wound Repair and Regeneration*, 15(5), 636-645.
- Mäkinen, K., Manninen, H., Hedman, M., Matsi, P., Mussalo, H., Alhava, E. et Ylä-Herttuala, S.

- (2002). Increased vascularity detected by digital subtraction angiography after VEGF gene transfer to human lower limb artery: a randomized, placebo-controlled, double-blinded phase II study. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 6(1), 127-33.
- Martin, A., Komada, M. R. et Sane, D. C. (2003). Abnormal angiogenesis in diabetes mellitus. *Medicinal Research Reviews*, 23(2), 117-145.
- Matsumoto, T. et Claesson-Welsh, L. (2001). VEGF Receptor Signal Transduction. *Sci. STKE*, 2001(112), re21-.
- Maulik, D., Ashraf, Q. M., Mishra, O. P. et Delivoria-Papadopoulos, M. (2008). Effect of hypoxia on protein tyrosine phosphatase activity and expression of protein tyrosine phosphatases PTP-1B, PTP-SH1 and PTP-SH2 in the cerebral cortex of guinea pig fetus. *Neuroscience Letters*, 432(3), 174-178.
- Mcdonald, T. J., Colclough, K., Brown, R., Shields, B., Shepherd, M., Bingley, P., Williams, A., et al. (2011). Islet autoantibodies can discriminate maturity-onset diabetes of the young (MODY) from Type1 diabetes. *Diabetic Medicine*, 28(9), 1028-1033.
- McDonald, T. J., Ellard, S. et T.J., M. (2013). Maturity onset diabetes of the young: Identification and diagnosis. *Annals of Clinical Biochemistry*, 50(5), 403-415.
- McNeill, E., Channon, K. M. et Greaves, D. R. (2010). Inflammatory cell recruitment in cardiovascular disease: murine models and potential clinical applications. *Clinical Science*, 118(11), 641-655.
- Meijer, W. T., Grobbee, D. E., Hunink, M. G., Hofman, A. et Hoes, A. W. (2000). Determinants of peripheral arterial disease in the elderly: the Rotterdam study. *Archives of Internal Medicine*, 160(19), 2934-2938.
- Mima, A., Kitada, M., Geraldles, P., Li, Q., Matsumoto, M., Mizutani, K., Qi, W., et al. (2012). Glomerular VEGF resistance induced by PKCd /SHP-1 activation and contribution to diabetic nephropathy. *The FASEB Journal*, 26(7), 2963-2974.
- Mitola, S., Brenchio, B., Piccinini, M., Tertoolen, L., Zammataro, L., Breier, G., Rinaudo, M. T., et al. (2006). Type I collagen limits VEGFR-2 signaling by a SHP2 protein-tyrosine phosphatase-dependent mechanism 1. *Circulation Research*, 98(1), 45-54.
- Moore, K. et Dalley, A. (2006). Anatomie médicale. In De Boeck (dir.), (2^e éd., p. 641-680). Bruxelles.
- Moriya, J. et Ferrara, N. (2015). Inhibition of protein kinase C enhances angiogenesis induced by platelet-derived growth factor C in hyperglycemic endothelial cells. *Cardiovascular Diabetology*, 14(1), 1-10.
- Murasawa, S. et Asahara, T. (2005). Endothelial progenitor cells for vasculogenesis. *Physiology (Bethesda)*, 20, 36-42.
- Nagasawa, T., Hirota, S., Tachibana, K., Takakura, N., Nishikawa, S. I., Kitamura, Y., Yoshida, N., et al. (1996). Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature*, 382(6592), 635-638.
- Nagy, G., Kovacs-Nagy, R., Kereszturi, E., Somogyi, A., Szekely, A., Nemeth, N., Hosszufalusi, N., et al. (2009). Association of hypoxia inducible factor-1 alpha gene polymorphism with both type 1 and type 2 diabetes in a Caucasian (Hungarian) sample. *BMC medical genetics*, 10(October), 79.
- Nagy, J. A., Dvorak, A. M. et Dvorak, H. F. (2007). VEGF-A and the Induction of Pathological Angiogenesis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 2(1), 251-275.
- Nakamura, N., Naruse, K., Kobayashi, Y., Matsuki, T., Hamada, Y., Nakashima, E., Kamiya, H.,

- et al. (2011). High glucose impairs the proliferation and increases the apoptosis of endothelial progenitor cells by suppression of Akt. *Journal of Diabetes Investigation*, 2(4), 262-270.
- Nakamura, Y., Patrushev, N., Inomata, H., Mehta, D., Urao, N., Kim, H. W., Razvi, M., et al. (2008). Role of Protein Tyrosine Phosphatase 1B in Vascular Endothelial Growth Factor Signaling and Cell-Cell Adhesions in Endothelial Cells. *Circulation Research*, 102(10), 1182-1191.
- National Heart, Lung, and B. I. (NHLBI) (2018). Atherosclerosis | National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI).
- Nawroth, R., Poell, G., Ranft, A., Klop, S., Samulowitz, U., Fachinger, G., Golding, M., et al. (2002). VE-PTP and VE-cadherin ectodomains interact to facilitate regulation of phosphorylation and cell contacts. *EMBO Journal*, 21(18), 4885-4895.
- Noma, A. (1983). ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle. *Nature*, 305(5930), 147-148.
- Nottebaum, A. F., Cagna, G., Winderlich, M., Gamp, A. C., Linnepe, R., Polaschegg, C., Filippova, K., et al. (2008). VE-PTP maintains the endothelial barrier via plakoglobin and becomes dissociated from VE-cadherin by leukocytes and by VEGF. *The Journal of Experimental Medicine*, 205(12), 2929-2945.
- Organisation mondiale de la santé (2016). Rapport mondial sur le diabète.
- Ortega, N., Hutchings, H. et Plouët, J. (1999). Signal relays in the VEGF system. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 4(3), D141-52.
- Osbak, K. K., Colclough, K., Saint-Martin, C., Beer, N. L., Bellanné-Chantelot, C., Ellard, S. et Gloyn, A. L. (2009). Update on mutations in glucokinase (GCK), which cause maturity-onset diabetes of the young, permanent neonatal diabetes, and hyperinsulinemic hypoglycemia. *Human Mutation*.
- Owen, K. R., Roland, J., Smith, K. et Hattersley, A. T. (2003). Adolescent onset Type 2 diabetes in a non-obese Caucasian patient with an unbalanced translocation. *Diabetic Medicine*, 20(6), 483-485.
- Pajusola, K., Aprelikova, O., Pelicci, G., Weich, H., Claesson-Welsh, L. et Alitalo, K. (1994). Signalling properties of FLT4, a proteolytically processed receptor tyrosine kinase related to two VEGF receptors. *Oncogene*, 9(12), 3545-3555.
- Paquin-Veillette, J., Lizotte, F., Robillard, S., Béland, R., Breton, M. A., Guay, A., Despatis, M. A., et al. (2017). Deletion of AT2 receptor prevents SHP-1-induced VEGF inhibition and improves blood flow reperfusion in diabetic ischemic hindlimb. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 37(12), 2291-2300.
- Potente, M., Gerhardt, H. et Carmeliet, P. (2011). Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell*, 146(6), 873-887.
- Pozzobon, T., Goldoni, G., Viola, A. et Molon, B. (2016). CXCR4 signaling in health and disease. *Immunology Letters*, 177(2016), 6-15.
- Pugh, C. W. et Ratcliffe, P. J. (2003). The von Hippel-Lindau tumor suppressor, hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) degradation, and cancer pathogenesis. *Semin Cancer Biol*, 2003 Feb;1(1), 83-89.
- Pugh, C. W. et Ratcliffe, P. J. (2003). Regulation of angiogenesis by hypoxia: Role of the HIF system. *Nature Medicine*.
- Raica, M. et Cimpian, A. M. (2010). Platelet-derived growth factor (PDGF)/PDGF receptors (PDGFR) axis as target for antitumor and antiangiogenic therapy. *Pharmaceuticals*, 3(3), 572-599.

- Rajagopalan, S., Mohler, E., Lederman, R. J., Saucedo, J., Mendelsohn, F. O., Olin, J., Blebea, J., et al. (2003). Regional Angiogenesis with Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in peripheral arterial disease: Design of the RAVE trial. *Am Heart J*, 145(6), 1114-1118.
- Rajagopalan, S., Olin, J., Deitcher, S., Pieczek, A., Laird, J., Grossman, P. M., Goldman, C. K., et al. (2007). Use of a constitutively active hypoxia-inducible factor-1 α transgene as a therapeutic strategy in no-option critical limb ischemia patients: Phase I dose-escalation experience. *Circulation*, 115(10), 1234-1243.
- Renard, C. B., Kramer, F., Johansson, F., Lamharzi, N., Tannock, L. R., Von Herrath, M. G., Chait, A., et al. (2004). Diabetes and diabetes-associated lipid abnormalities have distinct effects on initiation and progression of atherosclerotic lesions. *Journal of Clinical Investigation*, 114(5), 659-668.
- Resar, J. R., Roguin, A., Voner, J., Nasir, K., Hennebry, T. A., Miller, J. M., Ingersoll, R., et al. (2005). Hypoxia-inducible factor 1 α polymorphism and coronary collaterals in patients with ischemic heart disease. *Chest*, 128(2).
- Ribatti, D. (2008). The discovery of the placental growth factor and its role in angiogenesis: A historical review. *Angiogenesis*, 11(3), 215-221.
- Rigato, M., Monami, M. et Fadini, G. P. (2017). Autologous Cell Therapy for Peripheral Arterial Disease: Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized, Nonrandomized, and Noncontrolled Studies. *Circulation Research*, 120(8), 1326-1340.
- Rivard, A., Silver, M., Chen, D., Kearney, M., Magner, M., Annex, B., Peters, K., et al. (1999). Rescue of diabetes-related impairment of angiogenesis by intramuscular gene therapy with adeno-VEGF. *American Journal of Pathology*, 154(2), 355-363.
- Röder, P. V., Wu, B., Liu, Y. et Han, W. (2016). Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Experimental & Molecular Medicine*, 48(3), e219.
- Ross, R., Bowen-Pope, D. F. et Raines, E. W. (1990). Platelet-derived growth factor and its role in health and disease. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*.
- Saltiel, A. R. et Kahn, C. R. (2001). Glucose and Lipid Metabolism. *Nature*, 414(December), 799-806.
- Santiago, S., Ferrer, T. et Espinosa, M. L. (2000). Neurophysiological studies of thin myelinated (A delta) and unmyelinated (C) fibers: Application to peripheral neuropathies. *Neurophysiologie Clinique*, 30(1), 27-42.
- Sarkar, K., Fox-Talbot, K., Steenbergen, C., Bosch-Marcé, M. et Semenza, G. L. (2009). Adenoviral transfer of HIF-1 α enhances vascular responses to critical limb ischemia in diabetic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(44), 18769-18774.
- Sato, T. N., Tozawa, Y., Deutsch, U., Wolburg-Buchholz, K., Fujiwara, Y., Gendron-Maguire, M., Gridley, T., et al. (1995). Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature*, 376(6535), 70-4.
- Schaffer, S. W., Jong, C. J. et Mozaffari, M. (2012). Role of oxidative stress in diabetes-mediated vascular dysfunction: Unifying hypothesis of diabetes revisited. *Vascular Pharmacology*.
- Schreiber, A. K. (2015). Diabetic neuropathic pain: Physiopathology and treatment. *World Journal of Diabetes*, 6(3), 432.
- Selvin, E. et Erlinger, T. P. (2004). Prevalence of and Risk Factors for Peripheral Arterial Disease in the United States. *Circulation*, 110(6), 738 LP-743.
- Shah, M. S. et Brownlee, M. (2016). Molecular and cellular mechanisms of cardiovascular

- disorders in diabetes. *Circulation Research*, 118(11), 1808-1829.
- Shalaby, F., Janet, R., Yamaguchi, T. P., Gertsenstein, M., Wu, X. F., Breitman, M. L. et Schuh, A. C. (1995). Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*, 376(6535), 62-66.
- Sharma, K., Mccue, P., Dunn, S. R. et Diabetic, S. R. D. (2008). Diabetic kidney disease in the db / db mouse. *Renal Physiology*, (17), 1138-1144.
- Shaulian, E. et Karin, M. (2001). AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene*, 20(19 REV. ISS. 2), 2390-2400.
- Shaw, R. M. et Rudy, Y. (1997). Electrophysiologic effects of acute myocardial ischemia. A mechanistic investigation of action potential conduction and conduction failure. *Circulation research*, 80(1), 124-38.
- Shibuya, M. (2011). Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. *Genes and Cancer*, 2(12), 1097-1105.
- Shih, A. H. et Holland, E. C. (2006). Platelet-derived growth factor (PDGF) and glial tumorigenesis. *Cancer Lett*, 232(2), 139-147.
- Shrikhande, G. V., Scali, S. T., da Silva, C. G., Damrauer, S. M., Csizmadia, E., Putheti, P., Matthey, M., et al. (2010). O-Glycosylation regulates ubiquitination and degradation of the anti-inflammatory protein A20 to accelerate atherosclerosis in diabetic ApoE-null mice. *PLoS ONE*, 5(12).
- Shultz, L. D. et Sidman, C. L. (1987). Genetically determined murine models of immunodeficiency. *Annual review of immunology*, 5, 367-403.
- Shyu, K. G., Chang, H., Wang, B. W. et Kuan, P. (2003). Intramuscular vascular endothelial growth factor gene therapy in patients with chronic critical leg ischemia. *Am J Med.*, 114(2), 85-92.
- Sigma-Aldrich (2018). Bovine Aortic Endothelial Cells: BAOEC (Cryovial) | Sigma-Aldrich.
- Silvestre, J.-S., Smadja, D. M. et Lévy, B. I. (2013). Postischemic revascularization: from cellular and molecular mechanisms to clinical applications. *Physiological reviews*, 93(4), 1743-802.
- Simmons, K. M. (2015). Type 1 diabetes: A predictable disease. *World Journal of Diabetes*, 6(3), 380.
- Simons, M., Gordon, E. et Claesson-Welsh, L. (2016). Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17(10), 611-625.
- Singh, R. B., Mengi, S. A., Xu, Y. J., Arneja, A. S. et Dhalla, N. S. (2002). Pathogenesis of atherosclerosis: A multifactorial process. *Experimental and Clinical Cardiology*, 7(1), 40-53.
- Sinha, S., Vohra, P. K., Bhattacharya, R., Dutta, S., Sinha, S. et Mukhopadhyay, D. (2009). Dopamine regulates phosphorylation of VEGF receptor 2 by engaging Src-homology-2-domain-containing protein tyrosine phosphatase 2. *Journal of Cell Science*, 122(18), 3385-3392.
- Sinnreich, M., Taylor, B. V. et Dyck, P. J. B. (2005). Diabetic neuropathies: Classification, clinical features, and pathophysiological basis. *Neurologist*, 11(2), 63-79.
- Soriano, P. (1994). Abnormal kidney development and hematological disorders in PDGF beta-receptor mutant mice. *Genes & Development*, 8(16), 1888-1896.
- Srivastava, S., Vladykovskaya, E., Barski, O. A., Spite, M., Kaiserova, K., Petrash, J. M., Chung, S. S., et al. (2009). Aldose reductase protects against early atherosclerotic lesion formation

- in apolipoprotein E-Null mice. *Circulation Research*, 105(8), 793-802.
- Steiner, D. F., Park, S. Y., Støy, J., Philipson, L. H. et Bell, G. I. (2009). A brief perspective on insulin production. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 11(SUPPL. 4), 189-196.
- Stuible, M. et Tremblay, M. L. (2010). In control at the ER: PTP1B and the down-regulation of RTKs by dephosphorylation and endocytosis. *Trends in Cell Biology*, 20(11), 672-679.
- Subherwal, S., Patel, M. R., Kober, L., Peterson, E. D., Bhatt, D. L., Gislason, G. H., Olsen, A. M. S., et al. (2015). Peripheral artery disease is a coronary heart disease risk equivalent among both men and women: Results from a nationwide study. *European Journal of Preventive Cardiology*, 22(3), 317-325.
- Sugano, M., Tsuchida, K., Maeda, T. et Makino, N. (2007). SiRNA targeting SHP-1 accelerates angiogenesis in a rat model of hindlimb ischemia. *Atherosclerosis*, 191(1), 33-39.
- Sultan, S. A., Liu, W., Peng, Y., Roberts, W., Whitelaw, D. et Graham, A. M. (2015). The Role of Maternal Gestational Diabetes in Inducing Fetal Endothelial Dysfunction. *Journal of Cellular Physiology*, 230(11), 2695-2705.
- Tachibana, K., Hirota, S., Iizasa, H., Yoshida, H., Kawabata, K., Kataoka, Y., Kitamura, Y., et al. (1998). The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature*, 393(6685), 591-594.
- Takenaga, Y., Takagi, N., Murotomi, K., Tanonaka, K. et Takeo, S. (2009). Inhibition of Src activity decreases tyrosine phosphorylation of occludin in brain capillaries and attenuates increase in permeability of the blood-brain barrier after transient focal cerebral ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 29(6), 1099-1108.
- Tamarat, R., Silvestre, J.-S., Huijberts, M., Benessiano, J., Ebrahimian, T. G., Duriez, M., Wautier, M.-P., et al. (2003). Blockade of advanced glycation end-product formation restores ischemia-induced angiogenesis in diabetic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(14), 8555-8560.
- Tanii, M., Yonemitsu, Y., Fujii, T., Shikada, Y., Kohno, R. I., Onimaru, M., Okano, S., et al. (2006). Diabetic microangiopathy in ischemic limb is a disease of disturbance of the platelet-derived growth factor-BB/protein kinase C axis but not of impaired expression of angiogenic factors. *Circulation Research*, 98(1), 55-62.
- Tarr, J., Tarr, J. M., Kaul, K., Chopra, M., Kohner, E. M. et Chibber, R. (2013). Pathophysiology of Diabetic Retinopathy Pathophysiology of Diabetic Retinopathy, 2013(January).
- Tateishi-Yuyama, E., Matsubara, H., Murohara, T., Ikeda, U., Shintani, S., Masaki, H., Amano, K., et al. (2002). Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: A pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet*, 360(9331), 427-435.
- Tesfaye S, Boulton AJ, Dyck PJ, et al (2010). Toronto Diabetic Neuropathy Expert Group. Diabetic neuropathies: update on definitions, diagnostic criteria, estimation of severity, and treatments. *Diabetes Care*, 33(10), 2285-2293.
- Thangarajah, H., Yao, D., Chang, E. I., Shi, Y., Jazayeri, L., Vial, I. N., Galiano, R. D., et al. (2009). The molecular basis for impaired hypoxia-induced VEGF expression in diabetic tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(32), 13505-13510.
- Thornalley, P. J., Battah, S., Ahmed, N., Karachalias, N., Agalou, S., Babaei-Jadidi, R. et Daynay, A. (2003). Quantitative screening of advanced glycation endproducts in cellular and extracellular proteins by tandem mass spectrometry. *Biochemical Journal*, 375(3), 581-592.
- Tsui, H. W., Siminovitch, K. A., de Souza, L. et Tsui, F. W. L. (1993). Motheaten and viable

- motheaten mice have mutations in the haematopoietic cell phosphatase gene. *Nature Genetics*, 4(2), 124-129.
- Uutela, M., Laurén, J., Bergsten, E., Li, X., Horelli-Kuitunen, N., Eriksson, U. et Alitalo, K. (2001). Chromosomal location, exon structure, and vascular expression patterns of the human PDGFC and PDGFD genes. *Circulation*, 103(18), 2242-2247.
- Varma, S. (2005). Hyperglycemia alters PI3k and Akt signaling and leads to endothelial cell proliferative dysfunction. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*, 289(4), H1744-H1751.
- Vedantham, S., Noh, H., Ananthakrishnan, R., Son, N., Hallam, K., Hu, Y., Yu, S., et al. (2011). Human aldose reductase expression accelerates atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E-/-Mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 31(8), 1805-1813.
- Vincent, K. A., Shyu, K.-G., Luo, Y., Magner, M., Tio, R. A., Jiang, C., Goldberg, M. A., et al. (2000). Angiogenesis Is Induced in a Rabbit Model of Hindlimb Ischemia by Naked DNA Encoding an HIF-1 /VP16 Hybrid Transcription Factor. *Circulation*, 102(18), 2255-2261.
- Vinik, A. I. (2003). Management of neuropathy and foot problems in diabetic patients. *Clinical Cornerstone*, 5(2), 38-52.
- Vulesevic, B., McNeill, B., Geoffrion, M., Kuraitis, D., McBane, J. E., Lochhead, M., Vanderhyden, B. C., et al. (2014). Glyoxalase-1 overexpression in bone marrow cells reverses defective neovascularization in STZ-induced diabetic mice. *Cardiovascular Research*, 101(2), 306-316.
- Wang, W., Liu, L., Song, X., Mo, Y., Komma, C., Bellamy, H. D., Zhao, Z. J., et al. (2011). Crystal structure of human protein tyrosine phosphatase SHP-1 in the open conformation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 112(8), 2062-2071.
- Wang, Z., Zhang, Q., Zhu, W., Tao, J. et Wei, M. (2013). Angiogenic changes in co-cultures of mast cells and myocardial microvascular endothelial cells under hyperglycemic conditions. *International Journal of Molecular Medicine*, 31(5), 1177-1185.
- Warren, C. M. et Iruela-Arispe, M. L. (2010). Signaling circuitry in vascular morphogenesis. *Current Opinion in Hematology*, 17(3), 213-218.
- Warren, C. M., Ziyad, S., Briot, A., Der, A. et Iruela-Arispe, M. L. (2014). A ligand-independent VEGFR2 signaling pathway limits angiogenic responses in diabetes. *Science Signaling*, 7(307), 1-13.
- Wierup, N., Svensson, H., Mulder, H. et Sundler, F. (2002). The ghrelin cell: A novel developmentally regulated islet cell in the human pancreas. *Regulatory Peptides*, 107(1-3), 63-69.
- Wu, M.-Y., Li, C.-J., Hou, M.-F. et Chu, P.-Y. (2017). New Insights into the Role of Inflammation in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(10), 2034.
- Yamada, N., Horikawa, Y., Oda, N., Iizuka, K., Shihara, N., Kishi, S. et Takeda, J. (2005). Genetic Variation in the Hypoxia-Inducible Factor-1 α Gene Is Associated with Type 2 Diabetes in Japanese. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 90(10), 5841-5847.
- Ylä-Herttua, S., Markkanen, J. E. et Rissanen, T. T. (2004). Gene therapy for ischemic cardiovascular diseases: some lessons learned from the first clinical trials. *Trends in cardiovascular medicine*, 14(8), 295-300.
- Yoshida, K., Kharbanda, S. et Kufe, D. (1999). Functional interaction between SHPTP1 and the Lyn tyrosine kinase in the apoptotic response to DNA damage. *J Biol Chem*, 274(49), 34663-34668.

- Young, B., O'Dward, G. et Woodford, P. (2015). Atlas d'histologie fonctionnelle de Wheater. (De Boeck, Dir.) (3^e éd.). Bruxelles.
- Yu, L., Cecil, J., Peng, S. Bin, Schrementi, J., Kovacevic, S., Paul, D., Su, E. W., et al. (2006). Identification and expression of novel isoforms of human stromal cell-derived factor 1. *Gene*, 374(1-2), 174-179.
- Yuan, H. T., Khankin, E. V., Karumanchi, S. A. et Parikh, S. M. (2009). Angiopoietin 2 Is a Partial Agonist/Antagonist of Tie2 Signaling in the Endothelium. *Molecular and Cellular Biology*, 29(8), 2011-2022.
- Zeadin, M. G., Petlura, C. I. et Werstuck, G. H. (2013). Molecular Mechanisms Linking Diabetes to the Accelerated Development of Atherosclerosis. *Canadian Journal of Diabetes*, 37(5), 345-350.
- Zhang, J., Li, L., Li, J., Liu, Y., Zhang, C. Y., Zhang, Y. et Zen, K. (2015). Protein tyrosine phosphatase 1B impairs diabetic wound healing through vascular endothelial growth factor receptor 2 dephosphorylation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 35(1), 163-174.
- Zhao, Y., Vanhoutte, P. M. et Leung, S. W. S. (2015). Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *Journal of Pharmacological Sciences*, 129(2), 83-94.
- Zhou, J., Ni, X., Huang, X., Yao, J., He, Q., Wang, K. et Duan, T. (2016). Potential Role of Hyperglycemia in Fetoplacental Endothelial Dysfunction in Gestational Diabetes Mellitus. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 39(4), 1317-1328.
- Zito, C. I., Kontaridis, M. I., Fornaro, M., Feng, G. S. et Bennett, A. M. (2004). SHP-2 Regulates the Phosphatidylinositol 3'-Kinase/Akt Pathway and Suppresses Caspase 3-Mediated Apoptosis. *Journal of Cellular Physiology*, 199(2), 227-236.